

Aus der Klinik für Innere Medizin

Abteilung für Pneumologie

Direktor: Herr Prof. Dr. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Nicole Schreiber**

aus Zschopau

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

5. März 2015.

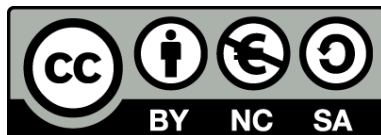
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referenten: Herr Prof. Dr. B. Müller/Herr Prof. Dr. S. Bauer

Korreferent: Herr Prof. Dr. P. König

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Kohlenstoffnanopartikel  | 1         |
| 1.1.1 Synthese und Verwendung  | 2         |
| 1.1.2 Eigenschaften  | 3         |
| 1.1.3 Eintrag in die Umwelt, Partikelpersistenz und Analytik   | 4         |
| 1.1.4 Risikobewertung  | 6         |
| 1.2 Aufnahme und Abwehr luftgetragener Partikel durch den<br>Respirationstrakt                             | 13        |
| 1.2.1 Partikeldeposition   | 13        |
| 1.2.2 Clearance Mechanismen  | 14        |
| 1.3 Anatomie und Physiologie des terminalen Respirationstraktes  | 16        |
| 1.4 Simulation der Partikelinhalation <i>in vivo</i>   | 20        |
| 1.4.1 Mausmodell   | 20        |
| 1.4.2 Vergleich verschiedener Applizierungsmethoden  | 21        |
| <b>2. Zielsetzung</b>  | <b>23</b> |
| <b>3. Material und Methoden</b>  | <b>25</b> |
| 3.1 Versuchstiere  | 25        |
| 3.2 Kohlenstoffnanopartikel und DQ12 Quarz   | 25        |
| 3.2.1 Charakterisierung und Herstellung stabiler CBNP-Suspensionen   | 28        |
| 3.3 Partikelapplizierung und Studiendesign   | 29        |
| 3.4 Untersuchungsschwerpunkte  | 31        |
| 3.4.1 Head-out Bodyplethysmographie  | 31        |
| 3.4.2 Histologie   | 32        |
| 3.4.2.1 Fixierung  | 32        |
| 3.4.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung  | 32        |
| 3.4.2.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion  | 33        |
| 3.4.2.4 Picrosirius Rot Färbung  | 33        |
| 3.4.2.5 Immunhistochemie   | 34        |
| 3.4.3 Typ II Pneumozyten Isolierung, Gewinnung der Blutproben und<br>Entnahme der bronchoalveolären Lavage | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.4 Bronchoalveoläre Lavage  | 38        |
| 3.4.4.1 Zelldifferenzierung  | 38        |
| 3.4.4.2 Gesamtproteingehalt  | 38        |
| 3.4.4.3 Phospholipidgehalt   | 39        |
| 3.4.4.4 Lactatdehydrogenase  | 40        |
| 3.4.4.5 Antioxidantienstatus   | 40        |
| 3.4.5 Plasma   | 41        |
| 3.4.5.1 IgE  | 41        |
| 3.4.5.2 Antioxidantienstatus   | 41        |
| 3.4.6 Typ II Pneumozyten   | 42        |
| 3.4.6.1 Proteinisolation   | 42        |
| 3.4.6.2 Gesamtproteingehalt  | 42        |
| 3.4.6.3 Gelelektrophorese und Western Blot                                 | 43        |
| 3.4.6.4 Antikörperdetektion und Membranstripping                           | 46        |
| 3.4.6.5 RNA-Isolation  | 47        |
| 3.4.6.6 cDNA-Synthese  | 48        |
| 3.4.6.7 Quantitative real-time RT-PCR                                      | 48        |
| 3.5 Computerprogramme  | 52        |
| 3.6 Statistische Auswertung  | 52        |
| <b>4. Ergebnisse</b>   | <b>53</b> |
| 4.1. Sterilität und Stabilität der Partikelsuspensionen                    | 53        |
| 4.2. Optimierung der Partikelretentionszeit                                | 54        |
| 4.2.1 Histologie   | 54        |
| 4.2.1.1 Veränderungen der Histologie des terminalen<br>Respirationstraktes | 55        |
| 4.2.1.2 Mukussekretion der Becherzellen                                    | 56        |
| 4.2.1.3 Kollagenexpression in der Lunge                                    | 57        |
| 4.2.1.4 Immunhistochemie   | 58        |
| 4.2.1.4.1 Antioxidantien-Proteinexpression                                 | 58        |
| 4.2.2 IgE-Konzentration im Plasma  | 60        |
| 4.2.3 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage                    | 61        |
| 4.2.4 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten       | 63        |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.4.1 Antioxidantien und Zytokin mRNA-Expression in<br>Typ II Pneumozyten  | 64 |
| 4.3 Toxizitätsvergleich oberflächenfunktionalisierter Carbon Black<br>Nanopartikel nach akuter Exposition  | 65 |
| 4.3.1 Einfluss der CBNP auf die Lungenfunktion   | 66 |
| 4.3.2 Histologie   | 67 |
| 4.3.2.1 Veränderungen der Histologie des terminalen<br>Respirationstraktes   | 67 |
| 4.3.2.2 Mukussekretion der Becherzellen  | 68 |
| 4.3.2.3 Kollagenexpression in der Lunge  | 69 |
| 4.3.2.4 Immunhistochemie   | 70 |
| 4.3.2.4.1 Proliferations- und Zelltod-Analyse  | 70 |
| 4.3.2.4.2 Antioxidantien-Proteinexpression   | 73 |
| 4.3.3 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage  | 76 |
| 4.3.4 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten   | 79 |
| 4.3.4.1 Antioxidantien-Proteinexpression in Typ II Pneumozyten   | 80 |
| 4.3.4.2 Antioxidantien, Zytokin, Surfactantprotein (SP-A, SP-D),<br>Cholinkinase (CK $\alpha$ , CK $\beta$ ) und Cholinphosphatcytidyl-<br>Transferase $\alpha$ (CTP $\alpha$ ) mRNA-Expression in<br>Typ II Pneumozyten | 80 |
| 4.4 Pilotstudie zur subchronischen Carbon Black Nanopartikel Exposition  | 82 |
| 4.4.1 Einfluss der CBNP auf die Lungenfunktion   | 83 |
| 4.4.2 Histologie   | 84 |
| 4.4.2.1 Veränderungen der Histologie des terminalen<br>Respirationstraktes und Mukussekretion der Becherzellen   | 84 |
| 4.4.2.2 Kollagenexpression in der Lunge  | 85 |
| 4.4.2.3 Immunhistochemie   | 85 |
| 4.4.2.3.1 Proliferations- und Zelltod-Analyse  | 85 |
| 4.4.2.3.2 Antioxidantien-Proteinexpression   | 87 |
| 4.4.3 IgE-Konzentration im Plasma  | 88 |
| 4.4.4 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage  | 88 |
| 4.4.5 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten   | 90 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.5.1 Antioxidantien, Zytokin, Surfactantprotein (SP-A, SP-D),<br>Cholinkinase (CK $\alpha$ , CK $\beta$ ) und Cholinphosphatcytidyl-<br>Transferase $\alpha$ (CTP $\alpha$ ) mRNA-Expression in<br>Typ II Pneumozyten | 90         |
| <b>5. Diskussion</b>   | <b>92</b>  |
| 5.1 Optimierung der Partikelretentionszeit   | 94         |
| 5.2 Toxizitätsvergleich oberflächenfunktionalisierter Carbon Black<br>Nanopartikel nach akuter Exposition  | 98         |
| 5.3 Einordnung der Ergebnisse zu den Beiträgen der Verbundpartner  | 108        |
| 5.4 Pilotstudie zur subchronischen Carbon Black Nanopartikel Exposition  | 111        |
| <b>6. Schlussfolgerung und Ausblick</b>  | <b>114</b> |
| <b>7. Zusammenfassung</b>  | <b>116</b> |
| <b>8. Summary</b>  | <b>118</b> |
| <b>9. Literaturverzeichnis</b>   | <b>120</b> |
| <b>10. Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>142</b> |
| <b>ANHANG</b>  | <b>148</b> |
| <b>I Übersicht der verwendeten Materialien</b>   | <b>148</b> |
| I. I Reagenzien  | 148        |
| I. II Arznei- und Betäubungsmittel   | 151        |
| I. III Geräte  | 151        |
| <b>II Veröffentlichungen und Präsentationen</b>  | <b>156</b> |
| <b>III Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>   | <b>157</b> |
| <b>IV Danksagung</b>   | <b>158</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Kohlenstoffnanopartikel

Kohlenstoff gehört zu den am meist verbreiteten Elementen der Erde. Er ist Grundbaustein aller Organismen und in der Natur z. B. als Kohlendioxid in der Atmosphäre oder in reiner Form als Graphit und Diamant im Boden zu finden. Kohlenstoffnanopartikel (griech. nano, der Zwerg) sind ausschließlich industriell hergestellte, ultrafeine Teilchen, bestehend aus nahezu reinem, elementaren Kohlenstoff (ICBA, 2014a, Abschn. 1). Im englischen Sprachraum tragen sie den Namen carbon black nanoparticles, kurz CB oder CBNP (Long et al., 2013).

Materialwissenschaftler fassen unter dem Begriff Nanopartikel (NP) alle Partikel zusammen, welche einen maximalen Durchmesser von 100 nm in mindestens einer Dimension aufweisen (Verma, 2013). Allerdings existiert keine einheitliche, international verbindliche Definition für diesen Fachbegriff.

Die NanoKommission des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) empfahl 2011 folgende vorläufige Definition: *„Hiernach werden unter Nanomaterialien künstlich hergestellte Materialien verstanden, die vor allem durch das veränderte Oberflächen-Volumen-Verhältnis in einem Größenbereich typischerweise unterhalb von 100 Nanometern ( $1\text{ nm}=10^{-9}\text{ m}$ ) häufig neuartige Eigenschaften entfalten.“* (BMU, 2011, Abschn. 1.1).

Die Kommission der Europäischen Union schlug im gleichen Jahr folgende Definition vor: *„'Nanomaterial' means a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm - 100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the number size distribution threshold of 50% may be replaced by a threshold between 1% and 50%.“* (European Commission, 2011, L 275/40).

Der Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland (BUND) sieht die Obergrenze von 100 Nanometern kritisch: *„Auch der BUND spricht sich gegen eine Begrenzung auf 100 Nanometer aus, da Partikel bis zu einer Größe von einigen Hundert Nanometern nanospezifische Eigenschaften aufweisen können. Partikel bis zu einer Größe von mindestens 300 Nanometern sollten deshalb als Nanopartikel behandelt werden.“*

*Gleiches gilt für Zusammenballungen von Nanopartikeln [...], die eine Größe von 100 Nanometern überschreiten, da auch sie an ihrer Oberfläche häufig reaktive Einzelpartikel aufweisen.“ (BUND, o. J., Abschn. 6).*

Die Definitionen der NanoKommission und der Europäischen Union unterscheiden sich bereits hinsichtlich des Partikelursprungs und der Präzision der Eigenschaftsbeschreibung. Die Stellungnahme des BUND macht außerdem deutlich, dass auch die Reaktivität größerer NP-Verbände einbezogen werden sollte. Auf Grund der derzeit noch fehlenden Kenntnisse über NP muss die Definition je nach Wissensstand ergänzt bzw. deren Größenbereich verschoben werden. Für diese Arbeit wurde der innerhalb der Materialwissenschaften gültige Bereich von  $\leq 100$  nm übernommen.

### **1.1.1 Synthese und Verwendung**

Die jährliche CBNP-Synthese beträgt ca. 8,1 Millionen t pro Jahr. Damit gehört dieser Rohstoff bereits heute zu den Top 50 der am meist produzierten Chemikalien weltweit (ICBA, 2014a, Abschn. 1). Eine im Frühjahr 2013 durch Ceresana veröffentlichte Marktstudie bestätigt dies und prognostiziert für die kommenden Jahre steigende Produktionsraten (Ceresana, 2013, Abschn. 3).

Herstellungsverfahren wie das Channelruß-, Gasruß-, Flammruß-, Thermalruß- und das Furnaceruß-Verfahren ermöglichen die Synthese von chemisch und physikalisch identischen CBNP-Primärpartikeln durch kontrollierte endotherme Kohlenwasserstoffpyrolyse. Der Großteil wird heute über das Furnace-Verfahren hergestellt. Dabei werden Erdöl oder Erdgas in einer Brennkammer (engl. furnace) verbrannt. In das über 1800 °C erhitzte Gas werden dann Rußöle eingedüst, unvollständig verbrannt und pyrolysiert. Der Abbruch des Herstellungsprozesses erfolgt per Wasserzufuhr. Durch Variierung der Temperatur, des Druckes und der Luft- bzw. Rohstoffzufuhr können gezielte Veränderungen an den CBNP vorgenommen werden. Das Pulver wird dann i. d. R. für den weiteren Transport verdichtet und pelletiert (Wang et al., 2003; Orion Engineered Carbons GmbH, 2013a; ICBA, 2014a, Abschn. 3). Acetylenruß entsteht durch Acetyलगasabbau, einem exothermen Prozess, der es ermöglicht, noch stärker strukturierte Partikel herzustellen (Wang et al., 2003; Klose et al., 2009).

Der Großteil der produzierten CBNP findet Anwendung als Verstärkerfüllstoff in der Gummiindustrie (Reifen, Kabel, Gummiprofile etc.). Weitere CBNP verwendende Branchen sind die Farbstoffindustrie (Schwarzpigment für Farben, Lacke, Tusche, Fasern und Kosmetika), Plastik verarbeitende Unternehmen (UV-beständige Plastikmaterialien, Verpackungen) und die Elektroindustrie (Elektroden, Ingenieurkeramiken, Kohlebürsten) (Long et al, 2013; Orion Engineered Carbons GmbH, 2013b). Recycling von Altreifen ermöglicht außerdem die Herstellung neuer Reifen bzw. die Wiederverwendung als Bestandteil von Straßenbelägen oder dient der Energiegewinnung durch Verbrennung (Pyrolyx AG, o. J., Abschn. 1 und 3).

Neben den genannten Hauptanwendungsgebieten gibt es noch eine Vielzahl weiterer CBNP-haltiger Produkte. Dazu gehören Lebensmittel, Lebensmittelverpackungen, pharmazeutische Produkte aber auch Schädlingsbekämpfungsmittel (Bikiarisa et al., 2006; Government of Canada, 2013, Synopsis; Canadian Legal Information Institute, 2014, Inorganic Colours).

### **1.1.2 Eigenschaften**

Derzeit werden mehr als 100 CBNP-Variationen für verschiedenste Anwendungsbereiche hergestellt (DGW, o. J. a, Abschn. 3). Die chemische Zusammensetzung dieser CB-Primärpartikel ist weitestgehend identisch. Sie bestehen zu 96 bis 99 % aus amorphem Kohlenstoff. Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel bilden den Rest und werden zumeist zur Oberflächenfunktionalisierung eingesetzt (DECHEMA e. V., o. J., Abschn. 1; Donnet et al., 1993; Long et al., 2013). Diese Funktionalisierung, der geringe Durchmesser von weniger als 100 nm und die damit verbundene enorme Vergrößerung der spezifischen Partikeloberfläche auf mehr als 1000 m<sup>2</sup> pro g verleihen den CBNP Eigenschaften, welche sich stark von denen natürlich vorkommender, chemisch identischer, nicht nano-skalierten Kohlenstoffverbindungen abheben (Donnet et al., 1993; Watson & Valberg, 2001; Jacobsen et al., 2008).

Allgemein gilt, je kleiner der Partikel, umso größer dessen spezifische Oberfläche und chemische Reaktivität (Nel et al., 2006). Nimmt der Partikeldurchmesser zu, so sinkt der Einfluss von Oberflächenkräften, Oberflächenladung und thermodynamischen Effekten.

Der Einfluss von Massenkräften ist auf Grund der Dichte von maximal  $1,89 \text{ g pro cm}^3$  nur sehr gering (Donnet et al., 1993). Bereits während der CBNP-Synthese kommt es auf Grund der oben genannten Eigenschaften zur Bildung von Aggregaten und Agglomeraten. Unter Aggregation versteht man das Aneinanderlagern von Primärpartikeln ( $> 100 \text{ nm}$ ) durch kovalente Bindungen. Diese sind nur durch starke mechanische Einwirkung von außen wieder aufzubrechen. Aggregate können sich wiederum zu noch größeren Agglomeraten zusammenlagern. Diese Formationen sind weniger stark miteinander verbunden und somit leichter wieder trennbar (DECHEMA e. V., o. J., Abschn. 2; Jiang et al., 2009). Die geschichtete Struktur der CB-Primärpartikel begünstigt außerdem die Adsorption von Molekülen verschiedensten Ursprungs, welche die chemischen, physikalischen und katalytischen Eigenschaften der Partikel weiter modifizieren können (HLUG, 2014, Informationsblatt).

### **1.1.3 Eintrag in die Umwelt, Partikelpersistenz und Analytik**

Lunge, Haut und Magen-Darm-Trakt stehen in ständigem Kontakt mit der Umwelt. Ist diese mit Schadstoffen angereichert, so kann dies direkte Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben (Simkó et al., 2008; IARC/WHO, 2013).

Der NP bzw. CBNP-Anteil in der Atmosphäre kann derzeit nur durch großen Aufwand bestimmt werden. Grund sind fehlende Techniken zur schnellen und einfachen Erfassung (Fiedeler & Fries, 2011). Messungen zur Feinstaubbelastungen unterscheiden i. d. R. nur nach der Größe des partikulären Materials (engl. particulate matter, PM) und nicht nach der qualitativen Zusammensetzung. Partikel mit einem Durchmesser von weniger als  $10 \text{ }\mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>) werden in Deutschland seit 2000 flächendeckend erfasst (BMU, 2003). Kleinere Partikel mit weniger als  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser (PM<sub>2,5</sub>) werden erst seit einigen Jahren stichpunktartig registriert (LANUV NRW, 2014). Messungen des NP-Anteils (PM<sub>0,1</sub>) sind weltweit nur sporadisch zu verzeichnen (Hughes & Cass, 1998; Pakkanen et al., 2001; BAAQMD, 2010). Herkömmliche Nachweismethoden wie z. B. Filteranlagen sind auf Grund der geringen Masse der NP nicht möglich (Fiedeler & Fries, 2011).



Die Analyse der Größenverteilung bzw. Partikelkonzentration und die Messung der spezifischen Oberfläche von NP ist sehr zeit- und kostenintensiv. Der Einsatz von Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie und dem Brunnauer Emmet Teller Verfahren (BET) ist jedoch unumgänglich, da u. a. zwischen natürlichen und synthetischen CBNP differenziert werden muss (Fiedeler & Fries, 2011).

Der Eintrag von CBNP in die Umwelt wird sehr widersprüchlich diskutiert. Levy, wissenschaftliche Berater der Internationalen Carbon Black Association (ICBA), verweist auf die Bindung der NP in der Produktmatrix (Levy et al., 2011). Studien über die Freisetzung von NP durch Kopierer bzw. Drucker und Untersuchungen zum Reifenabrieb zeigen jedoch deutliche NP-Freisetzungen (Dahl et al., 2006; He et al., 2007).

CBNP-Emissionen während des Produktionsprozesses oder durch die weiterverarbeitende Industrie sind auf Grund umfangreicher Sicherungsvorkehrungen sehr gering aber nicht ausgeschlossen (DGW, o. J. b). Erst im Frühjahr 2013 kam es laut Presse zu einer ungewünschten Freisetzung von Purex HS 45-CBNP durch die Hexpol Compounding GmbH (Grenz-Echo AG, 2013).

CBNP in der Atmosphäre können auf Grund geringer Absenkungsgeschwindigkeiten sehr lange Transportwege zurücklegen. Dies und ihre sehr große, reaktive Oberfläche fördern wiederum die Reaktion mit anderen Luftbestandteilen wie z. B. Antigenen, Pollen, Stickoxiden, Schwermetallen und anderen Partikeln. Die enorme Reduzierung von Einträgen gröberer Staubpartikel fördert gleichzeitig die Feinstaubkonzentrationszunahme, da der sogenannte „Scavenger-Effekt“ ausbleibt. Am Boden abgelagerte CBNP können außerdem erneut in die Atmosphäre gelangen, sich mit Bodenbestandteilen verbinden, sedimentieren oder ausgespült werden (HLUG, 2014, Informationsblatt). Eine Akkumulation in der Umwelt ist höchstwahrscheinlich, da es sich bei CBNP um sehr stabile, biologisch nicht abbaubare Formationen handelt (Government of Canada, 2013; ICBA, 2014b, Abschn. 2).

#### 1.1.4 Risikobewertung

Toxikologische Studien können der rasanten Entwicklung der NP-Industrie kaum standhalten. Bis zum heutigen Zeitpunkt fehlen Standardmessmethoden und validierte Prüfprotokolle für CBNP. Ursache für die erschwerte Risikobewertung ist vor allem die reaktionsfreudige Oberfläche, welche die Wahl der Untersuchungsmethoden stark einschränkt (Lichtabsorption, Bindung von Nachweisreagenzien etc.) bzw. eine umfangreiche Überarbeitung der Protokolle erfordert (Stone et al., 2009).

Bisherige *in vivo* Studien zeigten, dass die Oberflächen der Partikel entscheidenden Einfluss auf die Integrität des Respirationstraktes ausüben (Inoue et al., 2011; Saber et al., 2012). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass von der Lunge aufgenommene CBNP in Sekundärorgane translozieren und dort Genotoxizität auslösen (Bourdon et al., 2012b). In den vergangenen Jahren wurden z. T. Studien mit sehr hohen Konzentrationen und kurzen Partikelretentionszeiten durchgeführt, welche massive Schädigungen des Respirationstraktes bzw. eine Translokation der CBNP über den Blutkreislauf zeigten (Renwick et al., 2004; Shimada et al., 2006). Nach und nach wurden die Dosen immer weiter reduziert und verlängerte Partikelexpositionen einbezogen (Nassimi et al., 2010; Bezemer et al., 2011; Bourdon et al., 2012b; Kyjovska et al., 2014). Außerdem wurde getestet wie und in welchem Umfang CBNP auf vorgeschädigte Lungen bzw. während der Schwangerschaft wirken (Cesta et al., 2010; Jackson et al., 2012).

Der Vergleich einzelner *in vivo*-Versuche ist durch den Einsatz verschiedener Tiere, Tierstämme, Applikationsverfahren, CBNP bzw. variierenden NP-Konzentrationen und unterschiedlichen Partikelretentionszeiten nur bedingt möglich. Eine erst kürzlich veröffentlichte Literaturstudie über synthetisch hergestellte Nanomaterialien machte außerdem deutlich, dass viele Arbeiten auf Grund von möglichen Kontaminationen während der Herstellung, dem mangelnden Einsatz von Referenzsubstanzen, sowie durch fehlende, unzureichende oder fehlerhafte Partikelcharakteristik kaum verwertbar sind (Krug, 2014). Aus diesen Gründen sind die wichtigsten, innerhalb des letzten Jahrzehnts durchgeführten *in vivo* Versuche und deren Ergebnisse in Tabellenform (Tab. 1) festgehalten.

Gegenüber *in vitro* Studien bieten *in vivo* Untersuchungen die Vorteile, dass Clearance-mechanismen, Translokationsprozesse, Interaktion mit den Komponenten des Surfactants und die Wirkung auf verschiedene Zellarten der Lunge einbezogen bzw. analysiert werden können.

Epidemiologische Studien sind auf Grund noch fehlender, flächendeckender Messungen zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Studien über die Wirkung von CBNP auf den Menschen bezogen sich auf Arbeiter der CBNP-Industrie und zeigten u. a. vermehrte Krebserkrankungen. Auf Grund verschiedener Expositionszeiten und der variierenden Beschäftigungsdauer konnten jedoch keine Dosis bezogenen Aussagen getroffen werden (Hodgson & Jones, 1985; Wellmann et al., 2006; IARC/WHO, 2010). Die IARC (engl. International Agency for Research on Cancer; Gruppe 2b) stuft CBNP beim derzeitigen Wissensstand als potentiell krebserregend ein (IARC/WHO, 2010). Um die Wirkung von CBNP besser einschätzen zu können wurde das Verbundprojekt „Carbon Black“ aufgestellt. Diese Arbeit ist im Rahmen des BMBF geförderten Projektes entstanden, welches sich zur Aufgabe stellte, ein detailliertes Prüfprotokoll für verschiedenste, oberflächenfunktionalisierte CBNP zu entwickeln (Fehrenbach, 2010).

**Tab. 1: Übersicht der wichtigsten *in vivo* Experimente mit CBNP**

| <b>CBNP (Ø)<br/>Vehikel/Kontrolle</b>   | <b>Spezies</b>                             | <b>Applikation</b>                            | <b>Retentions-<br/>zeit</b>                  | <b>Methoden</b>   | <b>Effekte</b>  | <b>Referenzen</b>       |
|---|--|---|--|---|---|-------------------------|
| 125, 500 µg CBNP (14 nm);<br>0,9 %ige NaCl-Lsg.   | Ratte<br>Wistar<br>370-470 g<br>♂          | i. I.   | 1 d  | Serum<br>BAL  | verstärkte Infiltration PMN-Zellen, große<br>Epithelschäden, massive Zytotoxizität,<br>erhöhte Sensibilität der Makrophagen<br>gegenüber C5a, beeinträchtigen<br>Phagozytose                  | Renwick et<br>al., 2004 |
| 4 mg/kg Printex®90 (14 nm);<br>4 mg/kg Printex®25 (56 nm);<br>4 mg CBNP+2,5 mg LPS/kg;<br>PBS inkl. 0,05 % Tween®80 | Maus<br>ICR<br>6 wk<br>29-33 g<br>♂        | i. I.   | 1 d  | BAL<br>Körper- und<br>Lungengewicht<br>Histologie der<br>Lungen<br>Lungengewebe   | Störung der Blutgerinnung<br>CBNP/LPS: fördert Inflammation durch<br>gesteigerte lokale Expression von IL-1β<br>und Chemokinen<br>14 nm CBNP: stärkerer Effekt.                               | Inoue et<br>al., 2006   |
| 0, 2 mg/kg CBNP (8 nm);<br>biokompatibles,<br>nicht-ionisches Surfactant;<br>PBS inkl. 0,1 %<br>Pluronic®F-68       | Ratte<br>CDF (F344)/<br>CrIBR<br>6 wk<br>♀ | o. A.   | 1, 21 d                                      | Körpergewicht<br>BAL<br>Histologie der<br>Lungen<br>Lungengewebe  | keine Inflammation, keine Ausbildung<br>von „CBNP-Brücken“ zwischen den<br>Makrophagen  | Mangum et<br>al., 2006  |
| 1 mg Printex®90 (14 nm);<br>PBS   | Maus<br>ICR<br>10 wk<br>29-34 g<br>♀       | i. I.   | 0, 5, 10,<br>30 min;<br>1, 2, 6, 12,<br>24 h | Histologie<br>(Lunge, pulmonale<br>Lymphknoten,<br>Leber und Milz)  | Translokation in den Blutkreislauf  | Shimada et<br>al., 2006 |
| 0; 15,6 mg/m <sup>3</sup> CBNP<br>(~120 nm);<br>gefilterte Luft   | Ratte<br>Sprague-<br>Dawley<br>6 wk        | Inhalation<br>6 h pro d<br>5 d pro wk<br>4 wk | 1, 7, 14, 28,<br>30 d                        | Blut; Körper- und<br>Lungengewicht<br>Tail-cuff<br>Plethysmographie<br>(Herzfrequenz,<br>Blutdruck)<br>Histologie der<br>Lungen<br>Gewebe von Lunge<br>Aorta, Leber und<br>Milz | kein Einfluss auf das Körpergewicht,<br>keine CBNP außerhalb der Lunge, NP<br>beladene Makrophagen, Blutdruckstei-<br>gerung mit zunehmender Partikelexpo-<br>sition, IL-6, MCP-I, CRP erhöht | Niwa et<br>al., 2008    |

|  |  |                                    |                |   |   |                          |
|--|--|------------------------------------|----------------|---|---|--------------------------|
| 0, 5 mg/m <sup>3</sup> Butadienruß-NP;<br>HEPA-gefilterte Luft   | Maus<br>BALB/c<br>7 wk<br>♀                | Inhalation<br>4 h pro d<br>4 d     | 0, 5 d         | Whole-body<br>Plethysmographie<br>BAL<br>Histologie der<br>Lungen<br>Lungengewebe | akute Inflammation, NP beladene<br>Makrophagen in den Atemwegen,<br>Schädigung des Epithels und der<br>neutrophilen Granulozyten, oxidativer<br>Stress, erhöhte Genexpression des Aryl-<br>Hydrocarbon-Rezeptors  | Rouse et<br>al., 2008    |
| i. I.: 18, 54 µg Printex <sup>®</sup> 90<br>(14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. inkl.<br>10 % Maus-BAL<br><br>Inhalation: 52, 156 µg<br>Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm);<br>HEPA-gefilterte Luft | Maus<br>C57BL/6<br>ApoE-/-                 | i. I.;<br>Inhalation<br>30, 90 min | 3 h<br>1 d     | BAL<br>Lungengewebe   | CBNP/Instillation: stärkere Toxizität bei<br>ApoE-/- Mäusen als in C57BL/6,<br>toxischer als Inhalation (ApoE-/-<br>Mäuse), erhöhte IL-6, MIP-2, MCP-I<br>mRNA-Expression (3, 24 h), verstärkt<br>DNA-Strang-Brüche in den BAL Zellen,<br>vermehrte Infiltration Neutrophiler<br>Granulozyten, erhöhte Proteinwerte in<br>der BAL | Jacobsen et<br>al., 2009 |
| 2,5 mg LPS/kg oder PBS<br>(0 d) und 4 mg/kg CBNP<br>(1 d);<br>PBS  | Ratte<br>Sprague-<br>Dawley<br>6-8 wk<br>♂ | i. I.                              | 1, 21 d        | BAL<br>Histologie der<br>Lungen<br>Lungengewebe                                   | LPS/CBNP: keine Verschärfung der<br>Fibrose   | Cesta et<br>al., 2010    |
| 50, 150 cm <sup>2</sup> Partikelober-<br>fläche, CBNP (14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. inkl. PBS<br>und 5 % Rattenserum   | Ratte<br>Wistar<br>200-250 g<br>♀          | i. I.                              | 1 d            | BAL<br>Histologie der<br>Lunge  | leichte, perivaskuläre Neutrophile<br>Inflammation  | Cho et<br>al., 2010      |
| 440 µg/m <sup>3</sup> CBNP (7-12 nm);<br>gefilterte Luft   | Maus<br>C57BL/6<br>5-7 wk<br>♀             | Inhalation<br>1 d                  | 2, 8 h         | BAL<br>Blut/Plasma  | thrombogene Effekte   | Khandoga<br>et al., 2010 |
| 1, 10, 35, 100, 150, 200 µg<br>CBNP  | Maus<br>BALB/c<br>8-12 wk<br>♀             | Inhalation<br>1, 16 d<br>(7 d/wk)  | 4, 8, 12, 16 d | BAL<br>Histologie der<br>Lunge, Leber, Milz<br>und Niere                          | Inflammation, Genotoxizität   | Nassimi et<br>al., 2010  |
| 25 µg Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg.  | Maus<br>C57BL/6J<br>OTII.2                 | o. A.                              | 1 d            | BAL<br>Lymphknoten<br>Lungengewebe  | verstärkte Infiltration Neutrophiler<br>Granulozyten, Aufnahme von CBNP<br>durch Makrophagen, Förderung der<br>Reifung dendritischer Zellen   | Bezemer et<br>al., 2011  |

|   |  |   |   |   |  |                       |
|---|--|---|---|---|--|-----------------------|
| 50 µg Printex®90 bzw. Printex®25 (14, 56 nm);<br>0,03 U Schweinepankreas-elastase+50 µg Printex®90 bzw. Printex®25 (14, 56 nm);<br>0,03 U Schweinepankreas-elastase;<br>PBS inkl. 0,05 % Tween 80 | Maus<br>ICR<br>6-7 wk<br>29-33 g<br>♂              | i. I.   | 1, 7, 14 d  | BAL<br>Histologie der Lunge<br>Lungengewebe                                     | Printex®90: Inflammation<br>Printex®90 + Elastase: Neutrophile Inflammation begleitet mit der Expression proinflammatorischer Zytokine (1 d),<br>Emphysembildung (14 d),<br>Printex®25: weniger schädlich, dennoch Inflammation                          | Inoue et al., 2011    |
| 10 µg Printex®90 (14 nm);<br>20 µg Bleomycin+<br>10 µg Printex®90 (14 nm);<br>20 µg Bleomycin;<br>PBS inkl. 0,5 % Tween 80  | Maus<br>C57BL/6J<br>8-9 wk<br>19-21 g<br>♀         | i. I.   | 2, 7, 14, 21 d  | BAL<br>Histologie der Lungen<br>Körpergewicht<br>Lungengewebe<br>Lungenfunktion | Bleomycin/CBNP: verstärkte Kollagenbildung, Fibrose,<br>Einschränkung der Lungenfunktion, Einwanderung inflammatorischer Zellen (2, 7 d),<br>erhöhte KC, IL-6 (2 d), CCL2 (2, 7, 14 d) und TGF-β1 Konzentrationen (14 d) in der BAL<br>CBNP: ohne Effekt | Kamata et al., 2011   |
| 10x0,5 mg Printex®90 (7 d) (14 nm);<br>0,9% NaCl-Lsg.   | Ratte<br>Wistar WU (CrI:WI(WU) BR)<br>8 wk<br>♀    | i. I.   | 855 d   | Körpergewicht<br>Histologie der Lungen  | CBNP: induzierten stärkere, nicht-karzinogene Verletzungen als Quarz und mehr Verletzungen als Kohleruß; andauernde Inflammation; Tumorbildung   | Kolling et al., 2011  |
| 0,162 oder 0,268 mg Printex®90 (14 nm);<br>Vehikel  | Maus<br>C57BL/6<br>♀<br>oder<br>C57BL/6<br>Bom Tac | i. I.<br>0,162 mg oder 4x<br>0,067 mg<br>GD 7, 10, 15, 18 | 1, 3, 28 d<br>oder<br>26-27 d<br>während des Abstillens | Lungengewebe  | miR-135b ist an pulmonaler Reaktion beteiligt  | Bourdon et al., 2012a |
| 18, 54, 162 µg Printex®90 (14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. inkl.<br>10 % Maus-BAL  | Maus<br>C57BL/6<br>8 wk<br>♀                       | i. I.   | 1, 3, 28 d  | BAL<br>Lungen- und Lebergewebe  | Inflammation der Lunge, Genotoxizität im Lungen- und Lebergewebe und in der BAL  | Bourdon et al., 2012b |

|   |  |  |   |   |   |                           |
|---|--|--|---|---|---|---------------------------|
| whole-body Inhalation:<br>42 mg/m <sup>3</sup> Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm)<br><br>i. I.: 11, 54, 268 µg Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm)                   | Maus<br>C57BL/6<br>BomTac<br>Gestations-<br>tag 3<br>♀ | Inhalation<br>1 h pro d<br>GD 8-18<br><br>i. I. (4x)<br>GD 7, 10, 15, 18 | 3, 5 d<br>und während<br>des Abstillens | BAL<br>Leber der<br>Muttertiere und der<br>Nachkommen | kein Einfluss auf Gestation und<br>Laktation<br>Inflammation der Lunge der Muttertiere<br>Inhalation: DNA-Strang-Brüche der<br>Leber des Muttertieres und der<br>Nachkommen<br>Instillation: keine DNA-Strang-Brüche                          | Jackson et<br>al., 2012   |
| 25 U/kg Schweinepankreas-<br>elastase oder 0,9 % NaCl-Lsg.<br>(1 d)<br>und 100 bzw. 500 µg (7 d)<br>CBNP (~ 23 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. oder BSA (7<br>d)      | Ratte<br>Sprague-<br>Dawley<br>6-8 wk<br>♂             | i. I.  | 8, 21 d                                 | BAL<br>Histologie der<br>Lungen<br>Lungengewebe       | CBNP: erhöhte perivaskuläre und<br>peribronchiale Infiltration; erhöhte<br>Makrophagen MMP-12 Expression; ohne<br>Emphysembildung<br>Elastase/CBNP: Förderung der Elastase<br>induzierten Inflammation, ohne<br>Förderung der Emphysembildung | Roulet et<br>al., 2012    |
| 54 µg Flamrüss 101;<br>54 µg Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm)  | Maus   | i. I.  | 1 d                                     | Lungengewebe<br>BAL                                   | Inflammation in Abhängigkeit von der<br>Oberfläche, nicht vom Volumen<br>Printex <sup>®</sup> 90: stärkste Inflammation   | Saber et<br>al., 2012     |
| o. A.: 50 µg Printex <sup>®</sup> 90<br>(14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. inkl.<br>0,5 % BSA<br>intrapleurale Instillation:<br>5 µg Printex <sup>®</sup> 90 (14 nm) | Maus<br>C57BL/6<br>8 wk<br>♀                           | o. A.<br>intra-pleurale<br>Instillation                                  | 1, 7 d                                  | BAL<br>Pleura-Lavage<br>Lungengewebe                  | Unveränderte Histologie,<br>Aufnahme der Partikel durch<br>Makrophagen (Pleura),<br>Anreicherung nach 1 und 7 d in den<br>benachbarten Lymphknoten,<br>keine Anzeichen für Inflammation   | Schinwald et<br>al., 2012 |
| 18, 54, 162 µg Printex <sup>®</sup> 90<br>(14 nm);<br>Vehikel   | Maus<br>C57BL/6<br>♀                                   | i. I.  | 1, 3, 28 d                              | BAL<br>Lungengewebe                                   | Genexpression ähnlich wie bei anderen<br>Verletzungen bzw. Lungenfibrose  | Bourdon et<br>al., 2013   |
| 0,67; 2; 6; 162 µg Printex <sup>®</sup> 90<br>(14 nm)/Maus;<br>Wasser   | Maus<br>C57BL/6J<br>BomTac<br>8 wk<br>♀                | i. I.  | 1, 3, 28 d                              | BAL<br>Lungen- und<br>Lebergewebe                     | geringe CBNP-Konzentrationen:<br>marginale Inflammation,<br>Einstrom von Neutrophilen Granulozyten<br>(1 d), DNA-Strangbrüche in Zellen der<br>BAL und im Lungengewebe<br>hohe CBNP-Konzentrationen: verstärkte<br>Inflammation               | Kyjevská et<br>al., 2014  |

|  |   |   |   |  |  |                      |
|--|---|---|---|--|--|----------------------|
| Injektion: 200 µg Printex®90 (14 nm)/ OVA (0 d) + OVA (21 d); OVA<br>Intranasal: 400 µg Printex®90 (3 x 133,3 µg)/ OVA (0 d) + OVA (21, 22, 23 d); OVA                                   | Maus<br>BALB/<br>cAnNCrl<br>6-7 wk<br>♀ | Injektion;<br>intranasal  | 26 d  | BAL<br>Serum                                       | Printex®90/OVA-Injektion: erhöhte IgE-Werte<br>Printex®90/OVA-intranasal: erhöhte IgE- und IgG1-Werte, erhöhte BAL-Gesamtzellzahl, gesteigerte Infiltration eosinophiler Zellen Makrophagen  | Nygaard et al., 2013 |
| i. I.: 0,9; 2,8; 8,4 mg/kg Printex®90 (14 nm);<br>0,9 % NaCl-Lsg. inkl.<br>10 % Maus-BAL<br><br>Nose-only Inhalation:<br>20, 42 mg/m <sup>3</sup> Printex®90 (14 nm);<br>gefilterte Luft | Maus<br>C57BL/6J<br>♀                   | i. I.<br>(1 bzw. 4x);<br>nose-only<br>Inhalation<br>90 min<br>4 d<br>oder<br>1 h pro d<br>GD 8 - 18 | i. I.<br>1, 3, 28 d;<br>nose-only<br>Inhalation<br>1 h<br>5, 24, 25 d | BAL<br>Lungengewebe                                | Instillation: erhöhte Saa3 mRNA Werte<br>Inhalation (90 min): erhöhte Expression von Il-6, TNF und 4,4-fach erhöhte Saa3 mRNA-Expression<br>Inhalation: 2,9- bzw. 1,9-fach erhöhte Saa3 mRNA-Expression an Tag 5 bzw. nach 24 und 25 Tagen | Saber et al., 2013   |
| i. I.: 1 mg/kg Bleomycin;<br>0,9 % NaCl-Lsg.<br>Inhalation: CBNP oder<br>saubere Luft  | Maus<br>C57BL/6J<br>8 wk<br>♂           | i. I.<br>(1 d);<br>Inhalation<br>(5 d, 4 h)   | 7 d   | BAL<br>Körpergewicht<br>Lungengewebe<br>Mortalität | CBNP-Inhalation: Bleomycin induzierte Fibrose wurde verstärkt  | Saputra et al., 2014 |

BAL Bronchoalveoläre Lavage

BALB/c Mausestamm

CBNP Carbon Black Nanopartikel

BSA engl. bovine serum albumin

CCCL2 engl. chemokine (C-C motif) ligand 2

CRP C-reaktives Protein

CXXL-1 Signalstoff, Sortierung lysosomaler Proteine

C5a Komplementkomponente C5

C57BL/6 Mausestamm

d engl. day

DNA engl. deoxyribonucleic acid

GD Gestationstag

h engl. hour

HEPA engl. high-efficiency particulate air

i. I. intratracheale Instillation

KC engl. keratinocyte-derived cytokine

LPS Lipopolysaccharid

MCP-1 engl. monocyte chemoattractant protein-1

MIP engl. macrophage inflammatory protein

miR-135b micro RNA-135b

mRNA engl. messenger ribonucleic acid

o. A. oropharyngeale Aspiration

OVA Ovalbumin

PBS engl. phosphate buffered saline

PMN polymorphonukleäre Zellen

Saa3 Serum Amyloid A3 Apolipoprotein

TGF-β1 engl. transforming growth factor beta 1

wk engl. week



## **1.2 Aufnahme und Abwehr luftgetragener Partikel durch den Respirationstrakt**

### **1.2.1 Partikeldeposition**

Täglich passieren ca. 10 000 L Luft den Respirationstrakt (Beule, 2010). Dabei gelangen auch chemische Noxen (Schwefeldioxid, Stickoxide, Ozon, aromatische Kohlenwasserstoffe etc.), Mikroorganismen (Bakterien, Viren etc.), partikuläres Material (CBNP, Dieselruß etc.) und partikelassoziierte Stoffe (Pollen, Schwermetalle etc.) in den Respirationstrakt. Dort werden sie abgeschieden oder über die Ausatemluft aus der Lunge entfernt.

Partikeldeposition erfolgt durch Impaktion, Sedimentation, Diffusion und Interzeption in Abhängigkeit von der Partikeldichte, dem Partikeldurchmesser, dem Atemwegsquerschnitt und der Atemflussgeschwindigkeit (Stuart, 1984). Auf Grund der starken Abhängigkeit von der Anatomie und Physiologie des Respirationstraktes ist diese Abscheidung von Spezies zu Spezies sehr unterschiedlich (Asgharian et al., 1995).

Unter Impaktion versteht man die Ablagerung von Partikeln durch Aufprall. Innerhalb des Respirationstraktes findet dies vor allem an den Atemwegsverzweigungen statt. Hohe Atemwegsströme im oberen Bereich der Lunge, eine hohe Partikeldichte und ein großer Partikeldurchmesser fördern diesen Vorgang (Lourenco & Cotromanes, 1982; Stuart, 1984; Gehr & Heyder, 2005; Tena & Clarà, 2012).

Sedimentation wird durch einen großen Partikeldurchmesser und eine hohe Partikeldichte begünstigt, während bei der Diffusion die Partikelabscheidung mit Verringerung des Partikeldurchmessers zunimmt (Stuart, 1984). Ablagerung durch Kontakt der Atemwege mit einem dem Schwerpunkt entfernten Teil des Partikels bezeichnet man als Interzeption. Dieser Depositionsmechanismus tritt auf, wenn sich Partikel- und Atemwegsdurchmesser annähern. Neben den genannten Mechanismen führen auch elektrostatische Wechselwirkungen zur Partikeldeposition (Gehr & Heyder, 2005). Die größenabhängige Partikelabscheidung innerhalb des Respirationstraktes ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 0,01  $\mu\text{m}$  und zwischen 1 und 10  $\mu\text{m}$  werden zu einem großen Teil in den oberen Atemwegen (Nasen- und Rachenraum, Trachea) und unteren Atemwegen (Bronchien, Bronchioli) abgeschieden.

Partikel im Größenbereich von 0,01 bis 0,1  $\mu\text{m}$  deponieren vorrangig im Bereich der Alveolen, während Partikel zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{m}$  in allen Atemwegsabschnitten zu finden sind (Kreyling & Geiser, 2009).

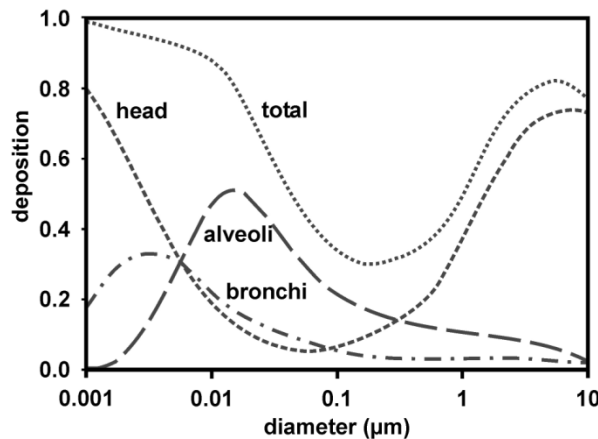


Abb. 1: Schematische Darstellung der Partikeldeposition im Respirationstrakt eines Erwachsenen (1,2  $\text{m}^3/\text{h}$ , Mundatmung), (Quelle: Kreyling & Geiser, 2009, Abb. modifiziert)

Des Weiteren gilt, je später die Partikelaufnahme während der Inhalation erfolgt, umso geringer die Eintrittstiefe (Scheuch et al., 1996). Nicht abgeschiedene Partikel werden z. T. über die Ausatemluft aus dem Respirationstrakt entfernt. Asbest, Quarz und Rußpartikel gelten jedoch als schwer eliminierbar (Gehr et al., 1996; Donaldson & Seaton, 2012).

Erhöhte Atemfrequenzen, wie sie bei verschiedenen Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, Bronchitis etc.) auftreten, können zu einer Erhöhung der Depositionsrate führen und so die Funktion des Respirationstraktes weiter einschränken (Frampton et al., 2004).

### 1.2.2 Clearance Mechanismen

Inhalierete NP können über verschiedene und z. T. miteinander verknüpfte Reinigungsmechanismen aus dem Respirationstrakt eliminiert werden. Husten- und Niesreflex gehören zur ersten unspezifischen Abwehr (Gehr et al., 1996). Auslöser des Niesreflexes ist der Kontakt einer Fremdschubstanz mit den Vibrissae der Nase bzw. die Reizung der Schleimhaut im Nasen-Rachen-Raum, wodurch Partikel mit großer Geschwindigkeit aus den Atemwegen entfernt werden (Corren et al., 2003). Fremdkörper größeren Umfangs können außerdem Berührungs- und Dehnungsrezeptoren irritieren und dadurch einen Hustenreflex auslösen.

Dieser ist gekennzeichnet durch eine Konstriktion der laryngealen und bronchialen Atemwege, so dass Fremdpartikel durch einen hohen Druck aus dem Respirationstrakt herausgerissen werden (Widdicombe et al., 1995; Gekle, 2010). Partikelhaltiges Sekret der Nase und der oberen Atemwege kann direkt über die Nase bzw. durch Verschlucken über den Verdauungstrakt entfernt werden. In der Trachea, den Bronchien und dem weit verzweigten Netz der Bronchiolen werden Fremdkörper über einem Richtung Rachen gerichteten Zilienschlag, dem sogenannten mukoziliären Transportsystem (engl. mucociliar clearance, MCC) entfernt. Ermöglicht wird dies durch eine visköse Solschicht im Bereich der Zilien und einer darauf liegenden viskösen Gelschicht. Während des Zilienschlages wird nur der obere, visköse Mukus mit den durch Kohäsion gebundenen Partikeln Richtung Rachen abtransportiert (Puchelle et al., 1992).

In der Trachea werden Transportgeschwindigkeiten von bis zu 20 mm pro min erreicht, dadurch ist es möglich inhalierte Partikel innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen zu eliminieren (Albert et al., 1969; Yeates et al., 1981). In den unteren Atemwegen ist dieser Mechanismus wesentlich langsamer, so dass die Partikelretentionszeit mehrere Tage bis Wochen beträgt. Ursache dafür ist u. a. die unterschiedliche anatomische Struktur. In den oberen Atemwegen sind die Zilien länger und enger aneinandergereiht (Livraghi & Randell, 2007; Kulkarni et al., 2011). Je nach Art des inhalierten Fremdpartikels kann der Kontakt mit der Atemwegsoberfläche die Zusammensetzung der Sol- und Gelschicht bzw. die Schlagfrequenz der Zilien verändern (Gehr et al., 1996; Weinhold & König, 2012). Rezidivierende Entzündungsreaktionen, angeborene Erkrankungen der Atemwege sowie Rauchen beeinflussen die MCC ebenfalls negativ (Verra et al., 1995; Nicod, 1999). Geringe Partikeldurchmesser mindern die Effizienz der MCC, da die Wahrscheinlichkeit einer Ablagerung im periziliären Bereich des Atemwegepitheliums zunimmt (Van As & Webster, 1972; Gehr et al., 1996). Gelangen die abgeschiedenen Partikel bis in die Sol-Phase so können sie direkt von Epithel- und dendritischen Zellen endozytotisch oder durch phagozytierende Zellen aufgenommen und über die Lymphe bis in andere Organe abtransportiert werden (Gehr et al., 1996). Innerhalb des terminalen Respirationstraktes können NP durch Alveolarmakrophagen inkorporiert und über das Blut- bzw. Lymphsystem transloziert werden. Artspezifisch gelangt ein mehr oder weniger großer Anteil der inhalierten Fremdschubstanz über die Surfactant-Pumpe zurück in den Bereich der MCC (Snipes, 1989; Gehr et al., 1996; Geiser, 2010).

Die alveoläre Clearance kann insgesamt mehrere Monate bis Jahre andauern. Der unmittelbare Kontakt zwischen NP und den Zellen des Atemwegs- und Alveolarepithels induziert zusätzlich die Rekrutierung inflammatorischer Zellen (Gehr et al., 1996; Barlow et al., 2005). Die Opsonierung mit Surfactant-Proteinen, Fibronectin, C-reaktivem Protein und IgG sorgt parallel für eine schnellere und effizientere Phagozytose durch Alveolarmakrophagen, welche in der Lage sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freizusetzen um weitere Leukozyten zu rekrutieren (Reynolds, 1987; Van Golde, 1995; Aam & Fonnum, 2007).

Die Interaktion der inhalierten Fremdstoffen mit den Komponenten (Glycoproteine, Proteine, Ionen, Lipide etc.) des Mukus bzw. Surfactants kann die Translokation zusätzlich beeinflussen (Kreyling et al., 2013). Die Biobeständigkeit der NP und deren relativ einfache Translokation über das Blut- und Lymphsystem können zu einer Anreicherung in der Lunge oder anderen Organen wie Herz, Leber, Milz und Gehirn führen und diese so in ihrer Funktion massiv einschränken bzw. dauerhaft schädigen (Oberdörster et al., 2009; Choi et al., 2010; Government of Canada, 2013).

### **1.3 Anatomie und Physiologie des terminalen Respirationstraktes**

Der terminale Lungenbereich ist der Ort des Gasaustausches, welcher durch eine besonders dünne Blut-Luft-Gewebeschranke und eine sehr große Oberfläche gewährleistet wird (West, 2009).

Der Gasaustausch beginnt beim Menschen bereits im Bereich der teilweise mit Alveolen besetzten Bronchioli respiratorii, wird im Ductus alveolaris fortgesetzt und im Saccus alveolaris mit Hilfe mehrerer tausend Alveolen maximiert (Gumbleton, 2001). Insgesamt setzt sich die humane Lunge aus ca. 480 Millionen dieser rundlich bis polyglonal geformten Bläschen zusammen, welche eine Gesamtgasaustauschfläche von bis zu 140 m<sup>2</sup> bilden und bei der Inspiration einen Durchmesser von bis zu 250 µm erreichen können (Schneider & Raabe, 1981; Ochs et al., 2004; Gumbleton, 2001).

Die Alveolarsepten der Alveolen sind von einem engmaschigen Kapillarnetz umgeben und luminal mit Typ I- und Typ II Pneumozyten, zwei strukturell und funktionell sehr unterschiedlichen Epithelzellen, ausgekleidet (Dobbs & Johnson, 2007).

Die ca. 50 bis 100 µm großen Typ I Pneumozyten bilden mit ihren bis zu 1000 nm dünnen zytoplasmatischen Ausläufern eine sehr geringe Diffusionsbarriere und gewährleisten so den Gasaustausch. Sie machen ca. 93 % der alveolären Fläche aus (Stone et al., 1992; Gumbleton, 2001).

Typ II Pneumozyten sind ca. 10 µm kleine, kuboidale Zellen, deren Hauptaufgabe die Produktion und Speicherung von pulmonärem Surfactant (engl. surface active agent), sowie das Recycling von Surfactantkomponenten ist und deren Anteil ca. 7 % der Alveolaroberfläche ausmacht (Crapo et al., 1982; Wright & Hawgood, 1989; Gumbleton, 2001). Surfactant ist ein ca. 0,1 bis 0,9 µm dünner osmophiler Film der die Alveolen umhüllt und sich vorrangig aus Lipiden (Dipalmitoylphosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol etc.) und Proteinen (Plasmaproteine; Surfactantproteine A, B, C und D) im Verhältnis 10:1 zusammensetzt (Bastacky et al., 1995; Hamm et al., 1996). Nach der Synthese wird die Substanz in Vesikeln, sogenannten lamellar bodies, der Typ II Pneumozyten gespeichert und nach Bedarf sezerniert. Synthese sowie Exozytose werden u. a. über die Dehnung der Lunge bei der Atmung stimuliert (Wright & Dobbs, 1991; Agassandian & Mallampalli, 2013). Durch die grenzflächenaktive Substanz wird die Oberflächenspannung während der Atmung reduziert und so ein Kollaps der kleineren Alveolen verhindert (Andreassen et al., 2010). Kommt es zu einer Schädigung der nicht teilungsfähigen und nur bedingt reparaturfähigen Typ I Zellen, so werden diese durch teilungsfähige Typ II Pneumozyten ersetzt (Adamson & Bowden, 1975).

Auf Grund ihrer Vielseitigkeit zählen Typ II Pneumozyten zu den stoffwechselaktivsten Zellen des terminalen Respirationstraktes. Bereits im Jahr 1977 veröffentlichten Mason und Williams eine Arbeit unter dem Titel „*Type II alveolar cell: Defender of the alveolus.*“ Darin werden insbesondere die Bedeutung von Surfactant und die Aufrechterhaltung der alveolären Struktur durch Reparaturprozesse hervorgehoben (Mason & Williams, 1977). Neuere Studien belegen immunregulatorische Interaktionen mit residenten und eingewanderten Zellen des Alveolarbereiches, sowie antimikrobische und antiinflammatorische Eigenschaften des Surfactants (Mason, 2006; Fehrenbach, 2001). Gelangen körperfremde Substanzen wie z. B. CBNP in die Lunge, so können diese die Surfactantsynthese, sowie die Antioxidantien- und Zytokin-Expression von Typ II Pneumozyten einschränken oder irreversibel stören.

Die Synthese von Phospholipiden, dem Hauptbestandteil des Surfactant, verläuft über den Kennedy-Pathway und wird über die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme Cholinase und Cholinphosphatcytidyltransferase reguliert (Kennedy & Weiss, 1956; Aoyama et al., 2004; Gibrellini & Smith, 2010). Die Cholinase katalysiert die Umsetzung von Cholin und Adenosintriphosphat zu Phosphocholin und Adenosindiphosphat. Das phosphorylierte Cholin wird anschließend mit Cytidintriphosphat und der Cholinphosphatcytidyltransferase zu Cytidindiphosphocholin und Pyrophosphat umgesetzt (Aoyama et al., 2004; Li & Vance, 2008; Gibrellini & Smith, 2010).

Die ebenfalls in Typ II Pneumozyten synthetisierten, hydrophilen Apoproteine SP-A und D dienen vor allem der Abwehrfunktion. Beide Proteine binden an Pathogenoberflächen und haben opsonierende Wirkung, d. h. sie sorgen für eine schnelle und effiziente Eliminierung der inhalierten Fremdschubstanz durch Alveolarmakrophagen (Wright, 1997). Veränderungen der Surfactantzusammensetzung lassen sich beispielsweise über die Bestimmung der Phospholipidkonzentration in der bronchoalveoläre Lavage ermitteln. Der Gesamtproteininhalt der BAL gibt außerdem Auskunft über die strukturelle und funktionelle Integrität des Alveolarbereiches. Kommt es zu einer partikelinduzierten Zellschädigung, so werden u. a. vermehrt Proteine frei. Zellmembranschäden können außerdem über die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) analysiert werden. Das in den Zellen ubiquitär exprimierte, stabile Enzym wird dann ebenfalls vermehrt freigesetzt (Markert, 1984).

Des Weiteren kann es zu einer direkten und indirekten Zunahme schädlicher Sauerstoffradikale durch luftgetragene, exogene Noxen im Bereich der Alveolen kommen (Kinnula & Crapo, 2003). Um oxidativen Stress zu verhindern bzw. zu reduzieren, verfügt die Lunge über eine Vielzahl antioxidativer Enzyme (Quinlan et al., 1994). Dazu gehören Superoxiddismutasen (SOD1, 2 und 3), Glutathionperoxidasen (GPX 3 und 4), Glutathionreduktase und die Katalase. Entzündungen des terminalen Respirationstraktes begünstigen zusätzlich die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Immunabwehrzellen wie z. B. Makrophagen (Forman & Torres, 2001). Dies kann außerdem zu einer modifizierten mRNA-Expression antioxidativer Enzyme, sowie zur Freisetzung pro-inflammatorisch Zytokine wie z. B. IL-6 in Typ II Pneumozyten führen.

IL-6 gilt als inflammatorisches Markerprotein und fördert die Produktion von Proteinen der akuten Phase und reguliert u. a. den Einstrom polymorphonukleärer Leukozyten (Kamimura et al., 2003; Niwa et al., 2008; Jacobsen et al., 2009; Chung et al., 2006).

Alveoläre Zellen, zu denen auch Alveolarmakrophagen und die bis im Ductus alveolares vorkommenden Clara Zellen zählen, produzieren ebenfalls Effektormoleküle, welche wiederum in der Lage sind weitere Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder benachbarte Epithelzellen zu beeinflussen und so zur Abwehr inhalierter Fremdstoffen bzw. zum Abbau entstandener reaktiver Sauerstoffspezies beizutragen (Sibille & Reynolds, 1990; Crystal et al., 2008).

## 1.4 Simulation der Partikelinhalation *in vivo*

### 1.4.1 Mausmodell

Die Maus ist ein sehr beliebter Modellorganismus in der medizinischen Grundlagenforschung. Allein zwei Drittel aller *in vivo* Versuche zur Risikobewertung von CBNP wurden an Mäusen durchgeführt (Tab. 1).

Neben den Gemeinsamkeiten gibt es eine Reihe anatomischer und physiologischer Unterschiede, welche bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse und bei der Übertragung der Risikobewertung für den Menschen berücksichtigt werden müssen. Eine Übersicht der wichtigsten strukturellen und funktionellen Unterschiede befindet sich in Tab. 2 (Nickel et al., 1999; Heldmaier & Neuweiler, 2004; Hildebrand & Goslow, 2004; Mestas & Hughes, 2004; Ochs et al., 2004; Liebich & Budras, 2010; Treuting & Dintzis, 2012).

**Tab. 2: Unterschiede des Respirationstraktes von Mensch und Maus**

|  | Mensch   | Maus   |
|--|--|--|
| Lobierung  | 2 Lobi links, 3 Lobi rechts  | 1 Lobus links, 4 Lobi rechts                   |
| Verzweigung des Blutkreislaufs   | Vasa privata: entlang des Bronchialbaums,<br>Venen: intersegmental | Arterien und Venen: entlang des Bronchialbaums |
| Atemwegsverzweigung  | dichotom   | nicht-dichotom                                 |
| Bronchus principalis (mm)  | ~ 13   | ~ 1  |
| Bronchioli (mm)  | < 1  | ~ 0,03   |
| Bronchioli terminales (mm)   | ~ 0,6  | ~ 0,01   |
| Bronchioli respiratorii (mm)   | ~ 0,5  | nicht vorhanden                                |
| Alveoli  | ~ 480 Millionen  | ~ 2 Millionen                                  |
| Blut-Luft-Schranke ( $\mu\text{m}$ )                                     | ~ 0,6  | ~ 0,3  |
| Gasaustauschfläche ( $\text{m}^2$ )                                      | ~ 140  | ~ 0,13   |
| Clearance Mechanismus/MCC der im Alveolarbereich phagozytierten Partikel | weniger effizient  | effizient                                      |
| Immunsystemregulation/Vermittlung der Typ I Reaktion                     | IgE  | IgE, IgG1                                      |

Treuting & Dintzis., 2012, Tab. 1, Tabelle modifiziert

Trotz Abweichungen der anatomischen Struktur, unterschiedlicher Clearance Effizienz und Unterschieden bei der Regulation des Immunsystems sind Versuche an Tieren derzeit unumgänglich. Das Mausmodell bietet eine Reihe von Vorteilen, zu denen die relativ einfache, weniger kostenintensive Haltung und eine schnelle Reproduktion zählen.



Außerdem besteht die Möglichkeit physiologische Parameter wie z. B. die Lungenfunktion per Head-out Bodyplethysmographie zu testen und eine große Anzahl von Antikörpern und bestehenden Untersuchungs-Kits zu nutzen. Des Weiteren bietet das Modell die Möglichkeit auf Knock-Out und transgene Mäuse zurückgreifen zu können und so die Wirkung von CBNP auf vorgeschädigte Lungen zu prüfen (Braun & Willnow, 1996).

#### **1.4.2 Vergleich verschiedener Applizierungsmethoden**

Die Aufnahme Luft getragener Partikel in den Respirationstrakt kann durch Inhalation, intratracheale Instillation und oropharyngeale Aspiration im Tierversuch simuliert werden (De Vooght et al., 2009).

Probenapplikation via Inhalation ist eine schonendes, realitätsnahes aber auch sehr kostenintensives Verfahren, bei dem vernebelte Partikel über spezielle Apparaturen zu den Versuchstieren gelangen und dort über die Atmung aufgenommen werden. Teile der Probe können sich dabei aber auch im Fell verfangen bzw. auf der Haut und an der Apparatur ablagern (Osier & Oberdörster, 1997; Rao et al., 2003). Dieser Probenverlust wird bei der intratrachealen Instillation durch direkte Applizierung des zu testenden Materials in die Trachea verhindert. Die Verteilung der Partikel bis in die Lungenperipherie ist jedoch weniger intensiv als bei der Inhalation bzw. durch oropharyngeale Aspiration (Brain et al., 1976; Foster et al., 2001; Rao et al., 2003; Osier & Oberdörster, 1997). Außerdem kann es bei dieser Methode zu einer Beeinträchtigung des Atemwegtraktes durch die eigentliche Applikation kommen (Brain et al., 1976). Dies wurde durch den Einsatz der oropharyngealen Aspiration umgangen. Hierbei wird die Partikelsuspension in den Rachen narkotisierter Mäuse appliziert und durch gezielte Unterbrechung der Nasenatmung aspiriert (Harkema et al., 2006; De Vooght et al., 2009). Die Partikel gelangen dadurch schonend bis in die peripheren Bereiche der Lunge. Das Verfahren erfordert außerdem ein geringes Probenvolumen und ist weniger zeit- und kostenintensiv (Rao et al., 2003; Lakatos et al., 2006; De Vooght et al., 2009). Ein Gesamtüberblick über die wichtigsten Vor- und Nachteile sowie Variationen der genannten Methoden sind in Tab. 3 festgehalten (Brain et al., 1976; Osier & Oberdörster, 1997; Driscoll et al., 2000; Foster et al., 2001; Rao et al., 2003; Lakatos et al., 2006; Huang et al., 2011).

**Tab. 3: Vor- und Nachteile der Applikationsverfahren**


---

**Inhalation**


---

**Vorteile**

- realitätsnah
- weniger Stress intensiv
- keine Schädigung/Beeinträchtigung des Respirationstraktes durch Narkose/Partikelapplizierung
- gute Partikelverteilung in der Lunge

**Nachteile**

- zeit- und kostenintensiv (Versuchsaufbau, z. T. großer Verbrauch an Testmaterial etc.)
- Vernebelung hoch toxischer Stoffe erfordert verschärfte Sicherheitsvorkehrungen
- Ablagerung der Testsubstanz (Haut, Fell etc.) je nach Variation sehr unterschiedlich
- Aufnahme der inhalierten Partikel nur sehr schwer bestimmbar
- Einschränkung bei der Wahl der Testmaterialien durch Filtration in der Nase (Nasensatmer)
- Test toxischer, karzinogener und radioaktiver Stoffe erfordert sehr umfangreiche Sicherheitsvorkehrungen (Ablagerung durch Vernebelung etc.)

**Variationen**

- whole-body, nose-only, Bolusinhaleation, Intratracheale Inhalation
- 

**Intratracheale Instillation**


---

**Vorteile**

- weniger zeit- und kostenintensiv (einfacher Versuchsaufbau, wenig Testmaterial notwendig etc.)
- akkurat, 100 % des Testmaterials gelangen in den Respirationstrakt, keine Ablagerung der Testsubstanz möglich (Haut, Fell etc.)
- spezielle Lungenregionen können durch gezielte Applikation ausgewählt werden
- ohne chirurgischen Eingriff möglich
- keine Einschränkung bei der Wahl der Testmaterialien, keine Filtration durch die Nase
- Sicherheitsvorkehrungen beim Test toxischer, karzinogener und radioaktiver Stoffe weniger intensiv als bei der Vernebelung während der Inhalation

**Nachteile**

- realitätsferneres und stressintensiveres Verfahren als Inhalation
- weniger intensive Partikelverteilung in der Lunge
- Umgehung der Clearance Mechanismen des oberen Respirationstraktes
- Schädigung/Beeinträchtigung des Respirationstraktes durch Narkose (veränderte Initialeffekte, Clearance Mechanismen und Translokation) und Partikelapplizierung möglich

**Variationen**

- Intranasale Instillation
- 

**Oropharyngeale Aspiration**


---

**Vorteile**

- weniger zeit- und kostenintensiv (einfacher Versuchsaufbau, wenig Testmaterial notwendig etc.)
- gute Partikelverteilung in der Lunge
- ohne chirurgischen Eingriff möglich
- keine Einschränkung bei der Wahl der Testmaterialien, keine Filtration durch die Nase
- Sicherheitsvorkehrungen beim Test toxischer, karzinogener und radioaktiver Stoffe weniger intensiv als bei der Vernebelung während der Inhalation

**Nachteile**

- realitätsferner als Inhalation
- Teil der applizierten Probe kann in den Magen-Darm-Trakt gelangen
- Umgehung der Clearance Mechanismen des oberen Respirationstraktes
- Schädigung/Beeinträchtigung des Respirationstraktes durch Narkose (veränderte Initialeffekte, Clearance Mechanismen und Translokation)
- Narkose z. T. ungenaue Dosierung des Anästhetikums

**Variationen**

- -
-

## 2. Zielsetzung

Steigende CBNP-Produktionsraten und deren vielseitige Verwendungsmöglichkeiten erhöhen das Risiko einer CBNP-Freisetzung bei Arbeits-, Recycling- und Verwitterungsprozessen. Die damit verbundenen Risiken für Mensch und Umwelt sind noch weitestgehend unbekannt, insbesondere die Homöostase des Respirationstraktes kann durch inhalierte CBNP aber massiv gestört werden. Ziel der Arbeit ist es, den Toxizitätsgrad funktionalisierter CBNP *in vivo* anhand geringer Dosen und einer kurzen Partikelpersistenz in der Lunge unter Einbezug der Oberflächengröße und der Zusammensetzung des Partikel-Suspendierungsmediums, im Mausmodell zu bestimmen.

**Die zentrale Hypothese dieser Arbeit lautet:**

**Die chemische Funktionalisierung der CBNP-Oberfläche ist ein entscheidender Faktor hinsichtlich der toxischen Wirksamkeit von CBNP im terminalen Respirationstrakt, insbesondere auf Typ II Pneumozyten.**

Folgende Arbeitsschritte werden für die Risikobewertung definiert:

1. Validierung geeigneter Untersuchungs- und Messmethoden
2. Erstellung eines geeigneten Kurzzeitexpositionsprotokolls
3. Konzipierung einer Pilotstudie zur Langzeitexposition

Bedingt durch unterschiedliche Partikeldeposition, Clearance-Mechanismen der Lunge und der enormen Reaktivität der CBNP sind *in vivo* Untersuchung anhand des Mausmodells derzeit unverzichtbar. Die Inhalation funktionalisierter CBNP soll mittels oropharyngealer Aspiration simuliert werden. Nach definierten CBNP-Depositionszeiten werden Einschränkungen der Lungenfunktion durch die nicht invasive Head-out Bodyplethysmographie geprüft. Histologische und immunohistochemische Methoden sollen Aufschluss über strukturelle Veränderungen der Lunge geben.

Die im terminalen Bereich der Lunge präsenten Typ II Pneumozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von Lungenfunktion und Struktur. Aus diesem Grund steht die Protein-Analyse, sowie Untersuchungen zur mRNA-Expression ausgewählter antioxidativer Enzyme, Surfactantproteine und Enzyme der Surfactantsynthese isolierter Typ II Pneumozyten im Vordergrund der Untersuchungen.

Veränderungen der Lungenhomöostase werden außerdem durch Analyse der qualitativen und quantitativen Zellzusammensetzung bzw. durch biochemische Untersuchungen der bronchoalveolären Lavage ermittelt.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Alle Versuche wurden an Pathogen freien, weiblichen BALB/c Mäusen (*Charles River Laboratories, Sulzfeld*) durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums Marburg bei 21 °C Lufttemperatur, 55 % Luftfeuchtigkeit, einem 12/12 h Tag-Nacht-Rhythmus, in individuell belüfteten Käfigen und freiem Zugang zu Futter und Wasser. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere für eine Woche zu maximal 6 Tieren pro Käfig akklimatisiert. Bei Partikelaspiration betrug das Alter der Tiere i. d. R. 10 Wochen, nur während der Zeitstudie und einem Teilversuch des Kurzzeitexperimentes kamen 6 Wochen alte BALB/c Mäuse zum Einsatz. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigten sich jedoch keine Unterschiede gegenüber den älteren Tieren.

Die Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (MR 20/11, Genehmigungs-Nr. 77/2010) und entsprechen den Richtlinien der deutschen Gesetzgebung und der Europäischen Union (Richtlinie 2010/63/EU).

#### **3.2 Kohlenstoffnanopartikel und DQ12 Quarz**

Die empirische Erfassung des Gefährdungspotentials von CBNP mit verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen erfordert eine detaillierte Partikelcharakteristik. Informationen über Partikeleigenschaften, verwendete Dosen, die Zusammensetzung der Suspendierungsmittel und die Ergebnisse der Partikelgrößenverteilungsmessung, sowie Angaben zu den Herstellern der nicht funktionalisierten und funktionalisierten CBNP und des Referenzquarzes DQ12 befinden sich in den Tab. 4 und 5.

**Tab. 4: Versuchstiergruppen, Partikeleigenschaften und Applikations-Dosen**

|   | <b>Printex®90<br/>ohne BSA</b>      | <b>Printex®90<br/>inkl. BSA</b>     | <b>Printex®90 mit<br/>9-Nitroanthracen<br/>inkl. BSA</b> | <b>Printex®90 mit<br/>Benzo[a]pyren<br/>inkl. BSA</b> | <b>Acetylenruß mit<br/>polyz. aromatischen<br/>Kohlenwasserstoffen<br/>inkl. BSA</b> | <b>DQ12 Quarz<br/>ohne BSA</b>          |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|--|---|
| <b>Abkürzung</b>  | Pr90 <sub>xµg</sub> <sup>-BSA</sup> | Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup> | NA-Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>                   | BaP-Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>               | PAK-AR <sub>xµg</sub> <sup>+BSA</sup>  | DQ12 <sub>xµg</sub> <sup>-BSA</sup>     |
| <b>Mittlerer Partikeldurchmesser (REM)</b>                    | 16,5 nm                             | 16,5 nm                             | 16,5 nm  | 16,5 nm   | 14,4 nm  | 1300,0 nm                               |
| <b>Partikeloberfläche (BET)</b>                               | 302 m <sup>2</sup> /g               | 302 m <sup>2</sup> /g               | 91 m <sup>2</sup> /g                                     | 91 m <sup>2</sup> /g                                  | 115 m <sup>2</sup> /g  | 1,5 m <sup>2</sup> /g                   |
| <b>Dosis der Zeitstudie/Probenvolumina</b>                    | 5 µg/50 µl                          | ND                                  | ND   | ND  | ND   | 5 µg/50 µl<br>172 µg/50 µl <sup>2</sup> |
| <b>Dosis der Kurzzeitexperimente/<br/>Probenvolumina</b>      | 7 µg/70 µl                          | 7 µg/70 µl                          | 7 µg/70 µl   | 7 µg/70 µl  | 7 µg/70 µl<br>15 µg/74 µl <sup>1</sup>   | 7 µg/70 µl                              |
| <b>Einzeldosen/Probenvolumina der<br/>Langzeitexperimente</b> | 7 µg/70 µl                          | ND                                  | ND   | ND  | ND   | 7 µg/70 µl                              |

BSA engl. bovine serum albumin

REM Rasterelektronenmikroskop

BET Bestimmung der Partikeloberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller

ND nicht durchgeführt

<sup>1</sup>Oberflächenadjustierung vs. Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup><sup>2</sup>Oberflächenadjustierung vs. Pr90<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup>

**Tab. 5: Oberflächenfunktionalisierung der Partikel, Eigenschaften und Zusammensetzung der Partikelsuspensionen, Hersteller, Teil II**

|  | <b>Printex®90<br/>ohne BSA</b>   | <b>Printex®90<br/>inkl. BSA</b>            | <b>Printex®90 mit<br/>9-Nitroanthracen<br/>inkl. BSA</b> | <b>Printex®90 mit<br/>Benzo[a]pyren<br/>inkl. BSA</b> | <b>Acetylenruß mit<br/>polyz. aromatischen<br/>Kohlenwasserstoffen<br/>inkl. BSA</b> | <b>DQ12 Quarz<br/>ohne BSA</b>   |
|--|----------------------------------|--|--|---|--|----------------------------------|
| <b>Funktionalisierung der<br/>Partikeloberfläche</b> | -                                | -  | 9-Nitroanthracen   | Benzo[a]pyren   | polyzyklische<br>aromatische<br>Kohlenwasserstoffe                                   | -                                |
| <b>Zusammensetzung des<br/>Suspendierungsmittels</b> | destilliertes<br>Wasser ohne BSA | destilliertes<br>Wasser inkl.<br>0,5 % BSA | destilliertes<br>Wasser inkl.<br>0,5 % BSA               | destilliertes<br>Wasser inkl.<br>0,5 % BSA            | destilliertes<br>Wasser inkl.<br>0,5 % BSA   | destilliertes<br>Wasser ohne BSA |
| <b>Z-Average<sup>1</sup></b>                         | 126,7 ± 1,2 nm                   | 153,8 ± 1,2 nm                             | 169,0 ± 2,0 nm   | 172,1 ± 2,6 nm  | 177,6 ± 0,6 nm (7 µg)<br>170,2 ± 0,4 nm (15 µg) <sup>2,3</sup>                       | *                                |
| <b>Zetapotential<sup>1</sup></b>                     | +35,7 ± 1,2 mV                   | -30,8 ± 1,3 mV                             | -31,0 ± 1,0 mV   | -34,8 ± 2,9 mV  | -34,4 ± 1,4 mV (7 µg)<br>-37,0 ± 2,8 mV (15 µg) <sup>2,3</sup>                       | *                                |
| <b>Hersteller</b>                                    | Evonik, Degussa<br>GmbH, Hanau   | Evonik, Degussa<br>GmbH, Hanau             | Evonik, Degussa<br>GmbH, Hanau/<br>KIT, Karlsruhe        | Evonik, Degussa<br>GmbH, Hanau/<br>KIT, Karlsruhe     | KIT, Karlsruhe   | Bergbauforschung<br>Essen        |

<sup>1</sup>Mittelwerte ± Standardabweichung<sup>2</sup>Oberflächenadjustierung vs. Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup><sup>3</sup>Für die Applizierung von PAK-AR<sub>15µg</sub><sup>+BSA</sup> wurde eine CBNP-Suspension mit 0,2 g CBNP/L am Standort Hannover hergestellt.

\* Auf Grund der geringen Suspensionsstabilität konnte keine Messung am Standort Karlsruhe (Karlsruher Institut für Technologie, KIT) durchgeführt werden.

### 3.2.1 Charakterisierung und Herstellung stabiler CBNP-Suspensionen

| Instrumente                     | Hersteller                              |
|---------------------------------|---|
| Analysenwaage LA 230S           | Sartorius AG, Goettingen, D             |
| Autoklav 5075 ELV- B            | biomedis, Gießen, D                     |
| Einweg Kapillarzellen, DTS 1070 | Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, D |
| Sonoplus HD 2070                | Bandelin, Berlin, D                     |
| Generator: GM2070               |   |
| Ultraschall Konverter: UW2070   |   |
| Sonotrode: VS70 T               |   |
| Zetasizer Nanoseries ZS         | Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, D |

Die Herstellung bzw. Entwicklung einer stabilen CBNP-Suspension und die Partikelcharakterisierung wurden durch das Karlsruher Institut für Technologie (KIT) erarbeitet (Bockhorn, 2014). Am Fraunhofer Institut Hannover erfolgte die Prüfung der CBNP-Proben auf bakterielle Verunreinigung und die Herstellung der CBNP-Suspensionen laut folgendem Protokoll: zunächst wurden alle benötigten Glaswaren mit destilliertem Wasser gespült bzw. die Instrumente mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend erfolgte die Autoklavierung des *Aqua bidestillata* und der Eppendorf Tubes für 20 min bei 120 °C und 2 bar. Danach wurden 0,05 g CBNP abgewogen und 500 ml steriles *Aqua bidestillata* hinzugegeben (Endkonzentration: 0,1 g CBNP/L). Zur Optimierung der Partikelgrößenverteilung erfolgte eine Sonifizierung des Gemisches bei folgender Geräteeinstellung: permanente Beschallung für 20 min bei maximaler Amplitude, 20 kHz Arbeitsfrequenz und HF-Leistung 70 W. Partikeleigenschaften wie z. B. der mittlere NP-Durchmesser in Suspension (Z-Average) und das Zetapotential wurden mittels Zetasizer Nanoseries ZS bestimmt (Hansen, 2014). Die Stabilität funktionalisierter CBNP-Suspensionen konnte nur durch die Zugabe von 0,5 % BSA ermöglicht werden.

Um Veränderungen der Partikelgrößenverteilung auszuschließen wurden die Suspensionen stets frisch hergestellt, zeitnah appliziert und zur erneuten Überprüfung zurück nach Hannover versandt. Die Herstellung der benötigten DQ12-Suspensionen erfolgte unmittelbar vor Partikelapplikation.



### 3.3 Partikelapplizierung und Studiendesign

Die Applikation der CBNP- und DQ12-Suspensionen, sowie der Negativkontrollen erfolgte per oropharyngealer Aspiration an Isofluran narkotisierten Mäusen. Durch pipettieren der Proben in den Rachen unter gleichzeitigem Verschluss der Nase gelangten die Suspensionen in die Lungen der obligaten Nasenatmer (Harkema et al., 2006; De Vooght et al., 2009). Eine Auflistung aller verwendeten Partikelsuspensionen und deren Volumina sind in Tab. 4 aufgelistet. Durch einen Vorversuch mit Evans Blue (nicht dargestellt) konnte die Aufnahme des applizierten Farbstoffes in den Atemwegstrakt und eine sehr gute Verteilung innerhalb der Lunge bestätigt werden.

Die Ermittlung der optimalen Partikelretentionszeit für den Vergleich verschiedener CBNP-Oberflächenfunktionalisierungen im Kurzzeitexperiment erfolgte durch eine Zeitstudie, dabei wurden Partikeldosen von 5 bis 172 µg und Partikelretentionszeiten von 24 h bzw. 3 und 7 Tagen getestet. Neben der zeitlichen Abstimmung von Partikelapplikation und Probengewinnung ermöglichte dieser Versuch histologische, biochemische und molekularbiologische Analysemethoden auf ihre Anwendbarkeit zu prüfen, da die hochreaktive Oberfläche der CBNP die Wahl der Methoden z. T. einschränkt bzw. eine Modifikation erfordert. Informationen über die verwendeten Partikeldosen und deren Suspension, den Zeitpunkt der oropharyngealen Aspiration und die Probengewinnung, sowie eine Übersicht der verwendeten Methoden sind in den Tab. 4 und 5 aufgelistet bzw. in Abb. 2 skizziert.

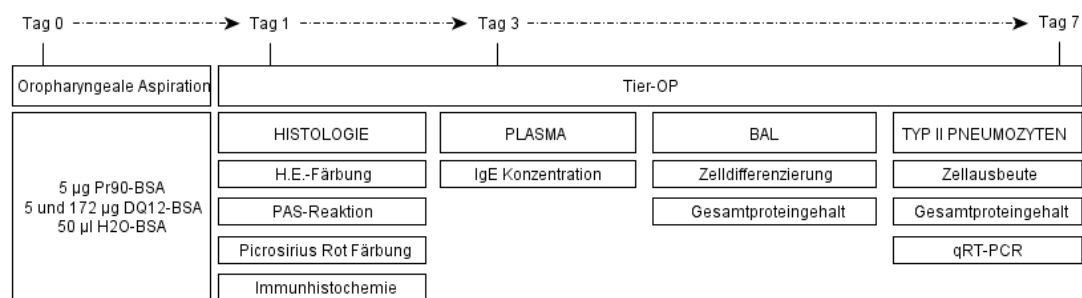


Abb. 2: Studiendesign der Zeitstudie (Bai et al., 2010, Fig. 2, Skizze modifiziert)

Ziel der Kurzzeitexperimente war es, die Wirkung verschiedener oberflächenfunktionalisierter CBNP (7 und 15 µg) miteinander zu vergleichen, dafür wurden alle in Tab. 4 aufgelisteten Suspensionen bei 3-tägiger Partikelretentionszeit getestet.

Die bereits während der Zeitstudie angewendeten Methoden wurden durch die Messung der Lungenfunktion an Tag 2 und Analyse der antioxidativen Kapazität (Trolox-Äquivalente), der Lactatdehydrogenase- (LDH) und Phospholipid-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) ergänzt. Außerdem wurde der Gesamtproteingehalt und die mRNA-Expression ausgewählter antioxidativer Enzyme, Surfactantproteine und Schlüsselenzyme der Surfactantsynthese von Typ II Pneumozyten untersucht. Eine genaue Auflistung der verwendeten Partikeldosen und Methoden, sowie eine Skizze über den Versuchsaufbau befindet sich in Abb. 3.

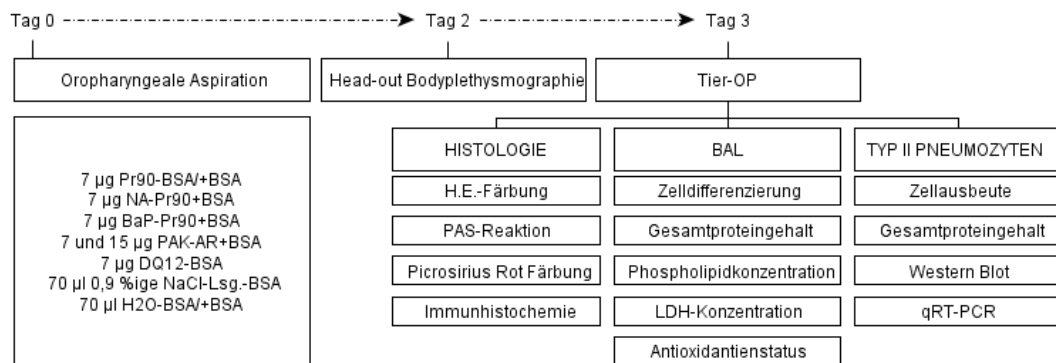


Abb. 3: Studiendesign des Kurzzeitexperiments (Bai et al., 2010, Fig. 2, Skizze modifiziert)

In einer Pilotstudie zur CBNP-Langzeitexposition (3 Monate, subchronischer Inhalationsversuch) wurden den Tieren wiederholt CBNP-Dosen ( $8 \times 7 \mu\text{g}$ ) verabreicht. Detaillierte Informationen über die verwendeten CBNP- bzw. DQ12-Dosen und deren Suspensionen befinden sich in den Tab. 4 und 5. Zeitpunkt bzw. Staffelung der oropharygealen Partikelaspiration, die zeitliche Gliederung der Untersuchungen und die Wahl der Untersuchungsmethoden sind in Abb. 4 dargestellt.

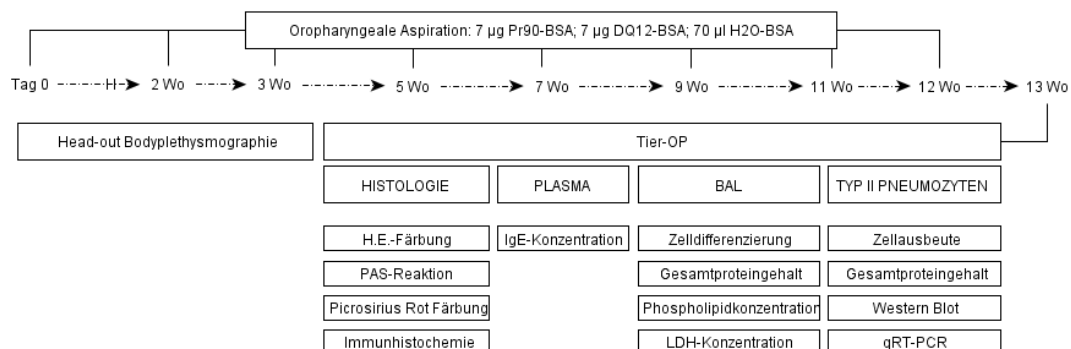


Abb. 4: Studiendesign des Langzeitexperiments (Bai et al., 2010, Fig. 2, Skizze modifiziert)

### 3.4 Untersuchungsschwerpunkte

#### 3.4.1 Head-out Bodyplethysmographie

Die Erfassung der Lungenfunktion erfolgte mittels nicht invasiver Head-out Bodyplethysmographie, einem Provokationstest beruhend auf der Sensibilität der glatten Atemwegsmuskulatur gegenüber der konstriktorisch wirksamen Reagenz Metacholin (MCh). Je stärker die Vorschädigung der Bronchien, umso größer der Atemwegswiderstand und umso kleiner der expiratorische Atemfluss bei bereits geringen MCh-Konzentrationen (Glaab et al., 2001).

Zur Aufzeichnung der Lungenfunktion wurden die Mäuse in durchsichtigen Zylindern, sogenannten Bodyplethysmographen, per Halskrause fixiert. Dabei ragten die Köpfe der Tiere in eine mit Luft gefüllte Expositions-kammer, welche wiederum an eine Vernebelungsapparatur angeschlossen war (Abb. 5). Durch die luftundurchlässige Latexkrause und ein Signalleitungsrohr am anderen Ende des Zylinders konnten die durch Ein- und Ausatmung entstandenen Druckänderungen innerhalb des Zylinders abgeleitet, registriert, verstärkt und an ein Oszilloskop und einen PC zur Auswertung weitergeleitet werden (Neuhaus-Steinmetz et al., 2000).

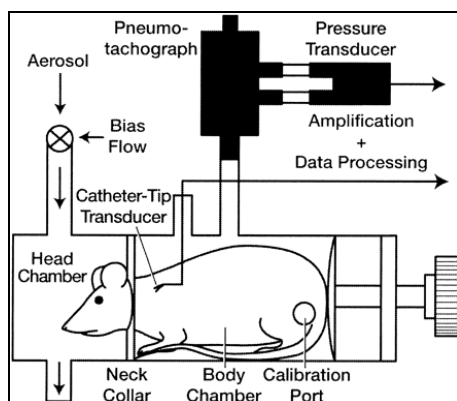


Abb. 5: Skizze des Versuchsaufbaus zur Lungenfunktionsprüfung (Quelle: Glaab et al., 2001, Fig. 1)

Nach Akklimationisierung der Tiere in den Plethysmographen erfolgte die Aufzeichnung der Ausgangswerte bei MCh-freiem Aerosol in der Expositions-kammer. Anschließend wurden die Mäuse steigenden MCh-Gradienten mit bis zu 125 mg MCh pro ml PBS ausgesetzt, um den expiratorischen Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen (EF50) zu bestimmen.

### **3.4.2 Histologie**

#### **3.4.2.1 Fixierung**

Einen Tag nach Prüfung der Lungenfunktion wurden je 2-3 nicht-lavagierte Lungen pro Versuchstiergruppe zur histologischen Begutachtung entnommen. Die Narkose der Mäuse erfolgte per i. p. Injektion eines Natrium-Pentobarbital (0,4 g pro kg Körpergewicht)/Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® (200 IU pro Maus) Gemisches.

Nach Öffnung des Bauch- und Brustraumes erfolgten die Kannulierung der Trachea und die Applizierung von ca. 700 µl Formalin pro Lunge. Zur weiteren Fixierung wurden die Lungen entnommen und 24 h in ca. 40 ml Formalin gelagert. Anschließend erfolgte die maschinelle Dehydrierung. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden ca. 2 bis 3 µm dünne Lungenschnitte mit dem Mikrotom angefertigt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für ca. 24 h bei 37 °C überschmolzen, durch 10-minütige Inkubation in Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert.

#### **3.4.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Übersichtsfärbungen wurden mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung (H. E.) angefertigt. Die Färbung negativ geladener Zellbestandteile wie z. B. DNA, RNA, Proteoglykane und diverse Muzine erfolgte durch 5-minütiges tauchen in Hämatoxylin-Lösung und 10-minütiges bläuen unter warmem Leitungswasser. Zellkern und Bereiche des rauen endoplasmatischen Retikulums erhielten so eine dunkelblau-violette Farbe. Das Zytoplasma und faserartige extrazelluläre Bestandteile wurden anschließend mit Eosin für 30 sec rot angefärbt (Welsch, 2006). Zuletzt wurden die Gewebeschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und mit Entellan® umschlossen. Nach Trocknung der Präparate über 24 h erfolgte die Auswertung am Mikroskop.

### **3.4.2.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion**

Zur Detektierung kohlenhydratreicher Komponenten (Glykogen, Glykoproteine etc.), wie sie z. B. in den Schleim produzierenden Becherzellen der unteren Atemwege vorkommen, wurden die Gewebeschnitte mittels Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) gefärbt.

Nach 5-minütiger Inkubation in 0,5 %iger Perjodsäure, kurzem Spülen mit destilliertem Wasser und 15-minütiger Behandlung mit Schiff's Reagenz wurden die Lungenschnitte 3 min unter warmem Wasser inkubiert und 30 sec mit destilliertem Wasser gespült. Die Bildung von Aldehydgruppen durch Perjodsäure und die anschließende Behandlung mit Schiff's Reagenz ermöglichte die rot-violette Anfärbung der kohlenhydratreichen Strukturen im Gewebe (Welsch, 2006).

Zusätzlich erfolgte eine Färbung der Zellkerne und des rauen endoplasmatischen Retikulums durch 2-minütige Inkubation in Hämatoxylin-Lösung und 3-minütiges Bläuen unter fließendem warmem Wasser. Nach der Entwässerung durch eine aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurden die Gewebeschnitte in Entellan® eingebettet, für 24 h getrocknet und unter dem Mikroskop beurteilt.

### **3.4.2.4 Picrosirius Rot Färbung**

Die Färbung mit Picrosirius Rot ermöglichte die Darstellung kollagener Fasern innerhalb des Lungengewebes durch Verstärkung der natürlichen Doppelbrechung unter zirkular polarisiertem Licht.

Die Gewebeschnitte wurden für 10 min mit Picrosirius Rot gefärbt und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und in Entellan® eingebettet. Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte unter zirkular polarisiertem Licht, da nur das Zusammenspiel zwischen Picrosirius Rot Färbung und der Doppelbrechung unter polarisiertem Licht eine unverfälschte Kollagenmarkierung erlaubt (Junqueira et al., 1979)

### 3.4.2.5 Immunhistochemie

- **Histostain<sup>®</sup>-SP Kit, Invitrogen<sup>®</sup> LAB-SA, Detection System**  
(Invitrogen<sup>TM</sup>, New York City, USA)
  
- **10 mM Citratpuffer (pH 6,0)**  
2,941 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat/L  
HCl zur Regulierung des pH-Wertes
  
- **3 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**  
180 ml Methanol  
20 ml 30 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

Der Nachweis antioxidativer Enzyme, proinflammatorischer Zytokine und die Detektion des Caspase 3-Apoptose- bzw. Ki-67-Proliferationsmarkers (Tab. 6) im Lungengewebe erfolgten mittels Immunhistochemie (IHC-P). Das Verfahren beruht auf einer spezifischen Bindung zwischen Primärantikörper und dem zu detektierenden Antigen innerhalb des Gewebeschnittes, welche durch Zugabe eines enzymkonjugierten Sekundärantikörpers und des dazugehörigen Substrates farbig markiert werden kann (Welsch, 2006).

Um die Bindung des Primärantikörpers zu ermöglichen bzw. unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden die Schnitte zunächst für 10 min in der Mikrowelle bei 150 W erwärmt, 10 min bei 400 W in 0,01 M Citratpuffer-Lösung gekocht, abgekühlt, mit destilliertem Wasser gespült und 5 min in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung (lichtgeschützt) inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit destilliertem Wasser und 1xPBS erfolgte die Rehydrierung der Schnitte laut Anleitung des Histostain<sup>®</sup>-SP Kits. Die Antikörper-Verdünnungen wurden wie in Tab. 6 beschrieben mit 1xPBS angefertigt. Nach dem Auftragen der Primärantikörper-Verdünnungen auf die Lungenschnitte erfolgte die ca. 24-stündige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Abschließend wurden die Schnitte mit Aquatex eingebettet, getrocknet und unter dem Mikroskop analysiert.

**Tab. 6: Übersicht der verwendeten Primärantikörper**

| <b>Antikörper</b>                                      | <b>Konzentration</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller/Vertrieb</b>                      |
|--|----------------------|-------------------|---|
| <b>Konstitutiv exprimiertes Gen (Positivkontrolle)</b> |                      |                   |   |
| β-Aktin  | 1 mg/ml              | 1:2500            | <i>Abnova GmbH, Heidelberg, D</i>               |
| <b>Antioxidative Enzyme</b>                            |                      |                   |   |
| Superoxiddismutase 1 (SOD1)                            | 1 mg/ml              | 1:1500            | <i>Abnova GmbH, Heidelberg, D</i>               |
| Superoxiddismutase 2 (SOD2)                            | 1 mg/ml              | 1:400             | <i>Abnova GmbH, Heidelberg, D</i>               |
| Glutathionreduktase (GR)                               | 1 mg/ml              | 1:500             | <i>Abcam plc, Cambridge, UK</i>                 |
| Glutathionperoxidase 3 (GPX3)                          | 1 mg/ml              | 1:500             | <i>LifeSpan, Biosciences, Inc. Seattle, USA</i> |
| Glutathionperoxidase 4 (GPX4)                          | 0,4 mg/ml            | 1:80              | <i>LifeSpan, Biosciences, Inc. Seattle, USA</i> |
| Katalase (KAT)   | -                    | 1:200             | <i>LifeSpan Biosciences, Inc. Seattle, USA</i>  |
| <b>Apoptosemarker</b>                                  |                      |                   |   |
| Caspase 3  | 1 mg/ml              | 1:150             | <i>Abcam plc, Cambridge, UK</i>                 |
| <b>Proliferationsmarker</b>                            |                      |                   |   |
| Ki-67  | 0,7 mg/ml            | 1:50              | <i>Abcam plc, Cambridge, UK</i>                 |

### 3.4.3 Typ II Pneumozyten Isolierung, Gewinnung der Blutproben und Entnahme der bronchoalveolären Lavage

#### Zusammensetzung der Antikörperplatten, Medien und Lösungen

- **Antikörperplatten**

6 ml Dulbecco`s 1xPBS ohne Ca & Mg

Tween20<sup>®</sup> zur Reduzierung der Oberflächenspannung (1 Tropfen/50 ml)

84 µl Anti-mouse CD45 (0,5 mg/ml; *BD Bioscience, Heidelberg, D*)

32 µl Anti-mouse CD16/CD32 (0,5 mg/ml; *BD Bioscience, Heidelberg, D*)

- **Medium I**

487,5 ml DMEM Low Glucose (1g/L; ohne L-Glutamin)

12,5 ml HEPES

1,71 g Glucose

0,142 g L-Glutamin

- **Medium II**

500 ml Medium I

50 ml FCS (steril filtriert)

5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

- **1 % Low Melt Agarose Lösung**

50 ml Dulbecco`s 1xPBS ohne Ca und Mg

0,5 g Low Melt Agarose

- **DNase I Lösung**

1,5 ml Medium I

375 µg DNase I

- **Dispase<sup>®</sup> I Lösung**

1 ml destilliertes Wasser zum Lösen von Dispase<sup>®</sup> 1

Dulbecco`s 1xPBS ohne Ca & Mg zur Herstellung der empfohlenen

Endkonzentration von < 2,44 U Dispase<sup>®</sup> 1/ml



Die Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL), der Blutproben und die Isolierung der Typ II Pneumozyten erfolgte nach einem modifizierter Protokoll von Corti und Mitarbeitern (1996).

Wie bei der Entnahme der Lungen für histologische Untersuchungen wurden die Tiere per i. p. Injektion eines Natrium-Pentobarbital (0,4 g pro kg Körpergewicht)/Heparin-Natrium-25000-ratiopharm<sup>®</sup> (200 IU pro Maus) Gemisches narkotisiert und der Bauch- und Brustraum eröffnet. Anschließend konnten ca. 0,5 ml Blut aus der Arteria abdominalis entnommen werden. Nach dem Öffnen und Kannulieren der Trachea erfolgte die Lavage der Lungen mit je 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung. Die Blut- und BAL-Proben wurden dann bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Nach dem Öffnen des linken Atriums erfolgte die Perfundierung der Lungen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Lungen vorsichtig mit 1,5 ml Dispase<sup>®</sup>I und 0,5 ml 1 %iger Low Melt Agarose gefüllt und für 2 min mit Eis gekühlt. Nach Entnahme der Lungen erfolgte eine 45-minütige Inkubation in 2 ml Dispase<sup>®</sup>I-Lösung bei RT. Anschließend wurden die Lungen in der DNaseI-Lösung 10 min bei RT geschnitten, 5 min leicht geschüttelt, mit 7 ml Medium I verdünnt und durch 2xMull, 150 µm und 20 µm Gaze filtriert. Die Zentrifugation des Filtrates erfolgte für 10 min bei 4 °C und 150 x g. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet in 10 ml Medium II resuspendiert und auf die am Vortag hergestellten Antikörperplatten (1 Antikörperplatte pro Lunge) transferiert und diese für 2 h bei 37 °C bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 10 % inkubiert. Dadurch konnten die Typ II Pneumozyten durch adhärente Bindung separiert werden, d. h. die im Filtrat enthaltenen Zellen wie z. B. Makrophagen und Lymphozyten wurden an die Antikörper (AK) gebunden und so von den Typ II Pneumozyten getrennt. Nach der Inkubation konnte der Überstand mit den Zellen vorsichtig von den Platten abgenommen und die Zellzahl mittels Trypan-Vitalitätsfärbung bestimmt werden. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 150 x g wurden die Zellen in Isol-RNA Lysisreagenz (5 bis 10 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

### 3.4.4 Bronchoalveoläre Lavage

#### 3.4.4.1 Zelldifferenzierung

Die auf Eis gelagerten BAL-Proben wurden zunächst für 10 min bei 4 °C bei 150 x g zentrifugiert und die zellfreien Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C zwischengelagert. Die Zellpellets wurden in 500 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert, mittels Zytocentrifuge (15 min, 40 x g, RT) auf die Objektträger aufgebracht und nach vollständiger Trocknung der Präparate mit May-Grünwald-Lösung 15 min behandelt, kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und 15 min mit Giemsa-Lösung (1:25 V.) gefärbt. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser und einer Trocknungszeit von ca. 24 h wurden die Zellen in Entellan<sup>®</sup> eingebettet. Die qualitative und quantitative Auswertung der Präparate erfolgte unter dem Mikroskop durch Auszählung von fünf Gesichtsfeldern.

#### 3.4.4.2 Gesamtproteingehalt

- **Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit**

*(Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D)*

Die Detektion beruht auf einer Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Komplexbildung mit Proteinen im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reduziert werden. Der Kontakt dieses Reaktionsproduktes mit Bicinchonininsäure (BCA) führt wiederum zu einem violetten Farbumschlag welcher per Photometer erfasst werden kann (Smith et al., 1985). Für die Messung wurden je 10 µl zellfreier, aliquotierter BAL-Überstand bzw. 10 µl Standard (24 bis 2000 µg BSA/ml) auf Mikrotiterplatten aufgebracht, mit je 200 µl Arbeitsreagenz vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Reaktionsansätze erfolgte die Messung am Photometer bei 562 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Microplate Reader Software der BMG LABTECH GmbH.

### 3.4.4.3 Phospholipidgehalt

#### Zusammensetzung der Lösungen, Positivkontrolle

- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Standard-Lösung**  
22,91 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100 ml destilliertes Wasser
- **Molybdat-Lösung**  
7,72 g Molybdat  
250 ml 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- **Reducer-Lösung**  
4,76 g Reducer  
30 ml destilliertes Wasser
- **Seronorm<sup>TM</sup> Lipid Standard Positivkontrolle (341 mg/dl)**  
(SERO AS, Billingstad, N)

Die Messung des Phospholipidgehaltes erfolgte nach der Methode von Bartlett (1959). Für den Nachweis wurden je 0,1 ml des zellfreien, aliquotierten BAL-Überstandes, der Positivkontrolle und der Standards (0; 0,1; 2,5; 5 und 10 µg/ml) in doppelten Ansätzen, in phosphatfreie Reagenzgläser gefüllt. Die Positivkontrolle und die Proben wurden dann mit 2 ml 20 %iger Trichloressigsäure vermischt und für 10 min bei RT inkubiert um die Phospholipide auszufällen. Nach Zentrifugation der Ansätze für 10 min bei RT und 1500 x g wurden die Überstände verworfen, die Reagenzgläser vorsichtig getrocknet und pro Präzipitat 0,1 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. Zur Oxidierung zum Phosphat wurden jedem Ansatz 0,5 ml Perjodsäure und 0,2 ml 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben und alles gevortext. Nach Inkubation der Proben für 15 min bei 200 °C und 30 min bei 100 °C wurden die Ansätze auf ca. 30 °C abgekühlt. Anschließend wurden 4 ml destilliertes Wasser, 0,5 ml Molybdat-Lösung und 0,2 ml Reducer-Lösung zugegeben, gevortext, bei 100 °C für 15 min inkubiert und abgekühlt. Durch das saure Milieu und die Reaktion der Molybdat- und Reducer-Lösungen mit dem Phosphat entstand ein blauer Farbumschlag welcher spektralphotometrisch bei 820 nm erfasst wurde.

### 3.4.4.4 Lactatdehydrogenase

- **Lyphochek<sup>®</sup> Assayed Chemistry Control (Level 1 und 2)**

*(Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D)*

1:4 V. mit 0,9 %ige NaCl-Lösung (40,3 und 80,0 U LDH/L)

- **Cytotoxicity Detection Kit**

*(Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

Der Lactatdehydrogenase-Nachweis (LDH) in der BAL beruht auf der Katalyse von L-Lactat zu Pyruvat mit Hilfe von  $\text{NAD}^+$ , welches gleichzeitig zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Die Aktivität der LDH ist somit proportional zum spektralphotometrisch detektierbaren Reaktionsprodukt  $\text{NADH}/\text{H}^+$  (Markert, 1984).

Pro Ansatz wurden 40  $\mu\text{l}$  Probe, Standardverdünnung bzw. Kontrolle mit 0,2 ml 80 mM N-Methylglucamin, 12,4 mM Lithiumlactat und 50  $\mu\text{l}$  12,5 mM NAD auf die Mikrotiterplatte aufgebracht, vorsichtig durchmischt und für 60 min bei 23 °C inkubiert. Die Messung des Extinktionsanstieges erfolgte bei 340 nm am Spektralphotometer. Alle Reaktionsansätze wurden doppelt angefertigt.

### 3.4.4.5 Antioxidantienstatus

- **ABTS Antioxidant Assay Kit**

*(Zen-Bio, Inc., North Carolina, USA)*

Eine durch CBNP Applizierung mögliche Veränderung des Antioxidantien-Status in der BAL wurde per ABTS Antioxidantien Assay analysiert. Die Methode beruht auf der spektralphotometrischen Erfassung der in oxidativ wässrigem Milieu gebildeten ABTS-Radikalkationen. Trolox inhibiert diese Reaktion und diente somit als Positivkontrolle. Zunächst wurden die Trolox-Standards mit Assay Puffer (0; 4,7; 9,4; 18,8; 38; 75; 150 und 350  $\mu\text{M}$  Trolox) und die Myoglobin-Verdünnungen laut Herstellerangaben angefertigt. Anschließend wurden je 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Standard in doppelter Ausführung auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, mit 20  $\mu\text{l}$  Myoglobin-Lösung und 100  $\mu\text{l}$  ABTS-Lösung vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Stoppreagenz wurde die Reaktion abgebrochen. Die spektralphotometrische Auswertung erfolgte bei 405 nm.

### 3.4.5 Plasma

Um das Plasma zu gewinnen wurden die während der Tier-OP entnommenen Blutproben für 10 min bei 4 °C und 12 000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

#### 3.4.5.1 IgE

- **Immunoperoxidase Assay for Determination of IgE in Mouse Samples**

*(GenWay Biotech, Inc., San Diego, USA)*

Die Messung der IgE-Konzentration des Plasmas erfolgte über einen ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay). Zuerst wurden IgE-Standards mit 0; 0,8; 1,6; 3,1; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 und 200 ng IgE pro ml hergestellt und Plasma 1:50 verdünnt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden in doppelter Ausführung auf die präparierten Mikrotiterplatten aufgebracht und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig entfernt, die Wells gespült und 100 µl Enzym-AK-Konjugat aufgebracht. Nach erneuter Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln wurden die Wells gespült, 100 µl TMB-Substrat-Lösung hinzugefügt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion abubrechen wurden 100 µl Stoppreagenz hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer bei 450 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer 4 Parameter Gleichung und der ReaderFit Software.

#### 3.4.5.2 Antioxidantienstatus

Die Plasmaproben wurden wie in Abschnitt 3.4.4.5 beschrieben auf ihren Antioxidantienstatus untersucht.

### 3.4.6 Typ II Pneumozyten

#### 3.4.6.1 Proteinisolation

- **0,3 M Guanidinhydrochlorid-Lösung**  
 2,9 g Guanidinhydrochlorid  
 95 ml Ethanol  
 5 ml destilliertes Wasser
- **1 %ige SDS-Lösung inkl. Protease-Inhibitor**  
 1 Tablette Protease-Inhibitor pro 50 ml 1 %iger SDS-Lösung

Die mittels Isol-RNA Lysereagenz isolierten Proteinlösungen wurden mit 0,3 ml Ethanol vermischt, für 3 min bei RT inkubiert und bei 4600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Phenol-Ethanol-Gemisch wurde anschließend auf zwei neue Eppendorf Tubes verteilt, mit 0,75 ml Isopropylalkohol gevortext, für 10 min bei RT inkubiert, für 10 min bei 4 °C und 11 000 rpm zentrifugiert und dreimal mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid-Lösung gewaschen. Danach konnten die Pellets für 20 min bei RT in Ethanol inkubiert und für 5 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert und getrocknet werden. Das Proteinpellet wurde dann in 50 µl 1 %iger SDS-Lösung inkl. Proteaseinhibitor und 2 µl 1 N NaOH-Lösung resuspendiert und für 15 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Bis zur Proteinmessung erfolgte die Lagerung der Proben bei -20 °C.

#### 3.4.6.2 Gesamtproteingehalt

- **Pierce® BCA Protein Assay Kit**  
*(Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D)*

Zur Messung des Proteingehaltes wurden die Proben 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Eine detaillierte Beschreibung der Proteinanalyse befindet sich in Abschnitt 3.4.4.2.

### 3.4.6.3 Gelelektrophorese und Western Blot

#### Zusammensetzung der Lösungen, Gele und Puffer

- **Lösung I**  
Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1)
- **Lösung II (pH 8,8)**  
18,7 g Tris-Base (1,5 M)  
0,3 g EDTA (8 mM)  
0,4 g Natriumdodecylsulfat (0,4 % SDS)  
100 ml destilliertes Wasser  
2 N HCl zur Regulierung des pH Wertes
- **Lösung III (pH 6,8)**  
6,2 g Tris-HCl (0,5 mM)  
0,3 g EDTA (8 mM)  
0,4 g Natriumdodecylsulfat (0,4 % SDS)  
100 ml destilliertes Wasser  
2 N NaOH zur Regulierung des pH Wertes
- **Trenngel (12 % iges Acrylamidgel, 4 Gele)**  
18,0 ml Lösung I  
11,2 ml Lösung II  
15,8 ml destilliertes Wasser  
300 µl APS (10 %)  
30 µl TEMED
- **Sammelgel (4 Gele)**  
2,4 ml Lösung I  
4,0 ml Lösung III  
6,8 ml destilliertes Wasser  
100 µl APS (10 %)  
20 µl TEMED

- **PageRuler™, Prestained Protein Ladder**  
(Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D)
- **Dissoziationspuffer**  
30 mM Tris-HCl wird in destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt  
15 % Glycerin  
3 % SDS  
0,04 % Bromphenolblau  
15 % Mercaptoethanol
- **Elektrophoresepuffer (pH 8,6)**  
60 g Glyzin  
20 g Tris-Base  
6 g SDS  
mit destilliertem Wasser auf 2 L auffüllen
- **Blot Puffer A (pH 9,0)**  
6,2 g Borsäure (50 mM) und NaOH zur Regulierung des pH-Wertes  
400 ml Methanol (20 %)  
mit destilliertem Wasser auf 2 L auffüllen
- **Blot Puffer B (pH 9,0)**  
6,2 g Borsäure (50 mM) und NaOH-Lösung zur Regulierung des pH-Wertes  
100 ml Methanol (5 %)  
mit destilliertem Wasser auf 2 L auffüllen
- **Coomassie-Blau-Lösung**  
2,5 g Coomassie-Blau  
450 ml destilliertes Wasser  
500 ml Ethanol  
50 ml Eisessig



- **Entfärber-Lösung**

450 ml destilliertes Wasser

450 ml Ethanol

100 ml Eisessig

Trenn- und Sammelgele wurden bereits einen Tag vor Beginn der Proteinelektrophorese hergestellt. Zunächst wurden die Glasplatten mit 70 % Ethanol gesäubert, zusammengebaut und in eine Apparatur eingespannt. Während der 30-minütigen Polymerisierung bei RT wurden die gegossenen Trenngele mit Isopropylalkohol überschichtet. Anschließend wurde dieser verworfen, die restliche Flüssigkeit vorsichtig abgetupft und die Sammelgele gegossen. Nach vollständiger Polymerisierung wurden die Gele in einer feuchten Atmosphäre bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Kurz vor Beginn der Elektrophorese wurden je zwei Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt und Elektrophoresepuffer in die Kammer eingefüllt.

Für die Elektrophorese wurden 10 bzw. 15 µg Protein mit 1 %-iger SDS-Lösung versetzt, mit gleichem Volumen Dissoziationspuffer vermischt und für 1 min zentrifugiert. Nach einer 3-minütigen Inkubation der Proben bei 95 °C wurden die Proben auf Eis abgekühlt, mit dem Marker auf die Gele aufgetragen und die Elektrophorese gestartet (25 mA pro Gel). Am Ende wurden die Gele aus der Halterung herausgelöst, das Sammelgel entfernt und die Trenngele sofort auf der Blot-Apparatur zwischen in Puffer A und B äquilibrierten Filtern und den vorbehandelten Membranen aufgebracht. Die Aktivierung der Membranen erfolgte durch Ethanol und Äquilibration in Puffer A.

Nach dem 2-stündigen Blotten (4 Gele, 166 mA) wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer inkubiert. Der Nachweis von Proteinresten auf den Gelen erfolgte mittels 10-minütiger Färbung durch Coomassie-Blau-Lösung und anschließender Behandlung mit Entfärber-Lösung.

### 3.4.6.4 Antikörperdetektion und Membranstripping

- **10xTBS Lösung**  
12,1 g Tris-Base (100 mM)  
87,0 g NaCl (1,5 M)  
mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen
- **Waschpuffer (4 Membranen)**  
1080 ml destilliertes Wasser  
120 ml 10xTBS  
600 µl Tween 20  
6 g Milchpulver
- **Blockpuffer (4 Membranen)**  
15 g Milchpulver (5 %)  
285 ml 1xTBS

**Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper**

| Antikörper                           | Konzentration | Verdünnung | Hersteller/Vertrieb                             |
|--------------------------------------|---------------|------------|---|
| <b>PRIMÄRANTIKÖRPER</b>              |               |            |   |
| <b>Konstitutiv exprimiertes Gen</b>  |               |            |   |
| β-Aktin                              | 1 mg/ml       | 1:1000     | <i>Abnova GmbH, Heidelberg, D</i>               |
| <b>Antioxidative Enzyme</b>          |               |            |   |
| Superoxiddismutase 2 (SOD2)          | 1 mg/ml       | 1:5000     | <i>Abnova GmbH, Heidelberg, D</i>               |
| Glutathionperoxidase 3 (GPX3)        | 1 mg/ml       | 1:1000     | <i>LifeSpan, Biosciences, Inc. Seattle, USA</i> |
| <b>SEKUNDÄRANTIKÖRPER</b>            |               |            |   |
| Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase | -             | 1:1000     | <i>Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, D</i>  |

- **SIGMA FAST<sup>™</sup> BCIP<sup>®</sup>/NBT, Alkaline Phosphatase Substrate**  
(*Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, D*)

Vor der Inkubation mit den Primärantikörpern wurde der Blockpuffer von den Membranen entfernt und diese mit reichlich Waschpuffer gespült. Die AK-Verdünnungen wurden mit 1xPBS laut Tab. 7 angefertigt und auf die Membranen aufgebracht. Nach 1-stündiger Inkubation bei RT wurden die Membranen mehrmals mit Waschpuffer gespült und der verdünnte Sekundärantikörper (Tab. 7) hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut mehrfach gespült und mit in destilliertem Wasser gelöstem Substrat inkubiert. Nach Färbung der Proteinbanden wurde das Substrat verworfen und die Membranen mit reichlich destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Um bereits getestete Blot-Membranen mit der  $\beta$ -Aktin-Kontrolle behandeln zu können wurden diese für 60 min bei RT mit Stripping Buffer inkubiert, mit reichlich destilliertem Wasser gespült, mit dem neuen Primärantikörper versetzt und wie bereits beschrieben mit dem Sekundärantikörper und dem Substrat detektiert.

#### **3.4.6.5 RNA-Isolation**

Für die RNA-Isolation wurden die in Isol-RNA Lysereagenz tiefgefrorenen Typ II Pneumozyten aufgetaut und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeder Probe 200  $\mu$ l Chloroform hinzugefügt, alles gevortext und für 3 min bei RT inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 11 000 rpm wurde die Proteinfraction von der RNA haltigen Lösung getrennt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurden 500  $\mu$ l Isopropylalkohol hinzugegeben, mit der RNA-Fraktion vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 11000 rpm wurden die Überstände verworfen und 1 ml 75 % Ethanol hinzugegeben. Die gevortexten Ansätze wurden dann für 5 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 30  $\mu$ l RNase freiem Wasser resuspendiert, für 10 min bei 55 °C inkubiert und bis zur cDNA-Synthese bei -80 °C gelagert.

### 3.4.6.6 cDNA-Synthese

- **peqGOLD cDNA Synthese Kit H Plus**

*(peqlab, Erlangen, D)*

Konzentration und Reinheitsgrad der aus den Typ II Pneumozyten isolierten RNA wurden mittels NanoDrop 1000 und der folgenden Formel ermittelt:  $OD_{620nm}/OD_{820nm}$ . Die cDNA-Synthese erfolgte laut Herstellerangaben.

Zuerst wurden 1 µg RNA mit 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer versetzt, das noch fehlende Volumen durch destilliertes, RNase freies Wasser ergänzt (Gesamtvolumen: 12 µl), gevortext, kurz zentrifugiert, 5 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis für 2 min abgekühlt. Die Anfertigung aller Reaktionsansätze erfolgte dabei auf Eis. Anschließend wurden jedem Reaktionsansatz 4 µl 5xReaktionspuffer, 1 µl peqGOLD RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt, gevortext und kurz zentrifugiert. Dann wurden die Ansätze für 60 min bei 42 °C und 5 min bei 70 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.4.6.7 Quantitative real-time RT-PCR

- **Rotor-Gene<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit**

*(Qiagen GmbH, Hilden, D)*

Die Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR (qRT-PCR) erfolgte mittels Rotor-Gene<sup>TM</sup> SYBR Green PCR Kit und dem Rotor-Gene Q in Doppelbestimmung, mit separaten Tubes für das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein L32 (L32) und das Zielgen. Das nicht regulierte Referenzgen wurde als interne Kontrolle genutzt. Die cDNA Templates der mit destilliertem Wasser behandelten Mäuse dienten als Kalibrator. Template freie Reaktionsansätze wurden als Negativkontrolle bei jedem Lauf mitgeführt. Detaillierte Auflistungen der verwendeten Oligonukleotide befinden sich in den Tab. 8, 9 und 10. Die Datenanalyse erfolgte mittels Rotor-Gene Q Series Software und der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode nach Livak & Schmittgen (2001).

**Tab. 8: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide, Teil I**

| Hersteller/Oligonukleotide          | Eurofins MWG Oberon ( <i>Ebersberg</i> ) |                             | Qiagen GmbH ( <i>Hanau</i> ) |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
|                                     | Sequenz (5' - 3') - forward              | Sequenz (5' - 3') - reverse | Katalog-Nr.                  |
| <b>Konstitutiv exprimiertes Gen</b> |  |                             |                              |
| Ribosomales Protein L32 (L32)       | -  | -                           | QT01752387                   |
| <b>Antioxidative Enzyme</b>         |  |                             |                              |
| Superoxiddismutase 1 (SOD1)         | CCGTACAATGGTGGTGGTCCATGAG                | GCAATCCCAATCACTCCACAGG      | QT01762719                   |
| Superoxiddismutase 2 (SOD2)         | -  | -                           | QT00161707                   |
| Superoxiddismutase 3 (SOD3)         | -  | -                           | QT00246169                   |
| Glutathionreductase (GR)            | TCGGAATTCATGCACGATCAC                    | TG TTCAGGCGGCTCACATAG       | -                            |
| Glutathionperoxidase 3 (GPX3)       | AGGAAGCCACATTCCCAGTC                     | TGCCAAGCCGTAAACACAG         | -                            |
| Glutathionperoxidase 4 (GPX4)       | TCTCAGCCAAGGACATCGAG                     | CCAGGATTCGTAAACCACACTC      | -                            |
| Katalase (KAT)                      | -  | -                           | QT01058106                   |

**Tab. 9: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide, Teil II**

| Hersteller/Oligonukleotide            | Eurofins MWG Oberon ( <i>Ebersberg</i> ) |                             | Qiagen GmbH ( <i>Hanau</i> ) |
|---------------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
|                                       | Sequenz (5' - 3') - forward              | Sequenz (5' - 3') - reverse | Katalog-Nr.                  |
| <b>Zytokin</b>                        |  |                             |                              |
| IL-6                                  | GGATACCACTCCCAACAGAC                     | CAATCAGAATTGCCATTGCAC       | -                            |
| IL-6R $\alpha$                        | ACAGAAGCAACGAGTGTCC                      | GAAGACACAGAGAAGCAACC        | -                            |
| <b>Apoptosemarker</b>                 |  |                             |                              |
| Caspase 3                             | -  | -                           | QT00260169                   |
| <b>Hydrophile Surfactant Proteine</b> |  |                             |                              |
| Surfactant Protein A (SP-A)           | TCTTCTTGACTGTTGTGCTG                     | TCTCCTTTGATACCATCTCTCC      | -                            |
| Surfactant Protein D (SP-D)           | ACAGCAACTCATCACAGCCC                     | TCTCCACACAGTTCTCTGCTC       | -                            |

**Tab. 10: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide, Teil III**

| Hersteller/Oligonukleotide                                 | Eurofins MWG Oberon ( <i>Ebersberg</i> ) |                             | Qiagen GmbH ( <i>Hanau</i> ) |
|--|--|-----------------------------|------------------------------|
|  | Sequenz (5' - 3') - forward              | Sequenz (5' - 3') - reverse | Katalog-Nr.                  |
| <b>Schlüsselenzyme der Phospholipidsynthese</b>            |  |                             |                              |
| Cholinkinase $\alpha$ (CK $\alpha$ )                       | CAGCAACTGCACAAGATCC                      | ATAAGCATCAGCTTCCGCC         | -                            |
| Cholinkinase $\beta$ (CK $\beta$ )                         | AACCTGCTCTTCCGATGCTCAC                   | TGCGAGAATGGCGAACATCAC       | -                            |
| Cholinphosphatcytidyl-Transferase $\alpha$ (CTP $\alpha$ ) | GAGCCTAACTTTTCTTACTCCC                   | CCACTCCTCTCTCCAATCAC        | -                            |

### 3.5 Computerprogramme

| Software                   | Firma   |
|----------------------------|---|
| Leica IM50 Image Manager   | Leica Microsystems Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, D |
| Microplate Reader Software | BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, D  |
| MS Office Microsoft®       | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D                         |
| ReaderFit Software         | ©Hitachi Solutions America, Ltd., San Francisco, USA                    |
| Rotor-Gene Q Series        | Qiagen GmbH, Hanau, D   |
| XLSTAT                     | STATCON, Wittenhausen, D  |
| yEd Graph Editor           | yWorks GmbH, Tübingen, D  |

### 3.6 Statistik

Die biometrische Auswertung der Daten erfolgte mittels nicht-parametrischem Kruskal-Wallis und Mann-Whitney Test durch das Statistikprogramm XLSTAT. Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die im Ergebnissteil aufgelisteten Daten repräsentieren die errechneten Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM).



## 4. Ergebnisse

Das toxische Potential von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) ist auf Grund noch fehlender, standardisierter Untersuchungs-Methoden bzw. -Richtlinien weitestgehend unbekannt. Daher sind empirische Untersuchungen zur Bestimmung ihres Gefährdungspotentials notwendig. Die vorliegende Arbeit geht dieser Fragestellung nach und fokussiert dabei den Respirationstrakt, da er als primäres Zielorgan luftgetragener Partikel gilt. Getestet wurden CBNP mit verschiedenen Oberflächen nach 1, 3 und 7-tägiger Partikelretentionszeit sowie das Gesundheitsrisiko nach subchronischer Partikelexposition.

### 4.1 Sterilität und Stabilität der Partikelsuspensionen

Die zentrale Herstellung und Charakterisierung streng definierter CBNP erfolgte am Karlsruher Institut für Technologie, während die Messung der Partikelgrößenverteilung in Suspension sowie die Prüfung der Sterilität am Fraunhofer Institut Hannover stattfand.

Die Messung der Partikelgrößenverteilung erfolgte vor und nach Partikelapplizierung am Standort Marburg, da bereits der Transport Veränderungen der NP-Größenverteilung hervorrufen kann. Dadurch wurde gesichert, dass die Partikelgrößenverteilung in den Suspensionen über eine lange Zeit stabil war. Die zentrale Herstellung und Prüfung der Partikelsuspensionen und die abschließende Messung der Partikelgrößenverteilung am Standort Hannover garantierten somit für alle am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen qualitativ identische CBNP-Suspensionen. Eine detaillierte Übersicht über die verwendeten Partikel und Partikelsuspensionen befindet sich in den Tab. 4 und 5.

## 4.2 Optimierung der Partikelretentionszeit

Für den Toxizitätsvergleich oberflächenfunktionalisierter CBNP im Kurzzeitexperiment war es notwendig einen optimalen Untersuchungszeitraum zu finden. Das Optimum wurde aus Partikelretentionszeiten von 1, 3 und 7 Tagen ermittelt. Dabei wurden folgende Gruppen miteinander verglichen:  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  CBNP,  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Referenzpartikel und die  $\text{H}_2\text{O}_{50\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle. Grundsätzlich hat die Partikeloberfläche entscheidenden Einfluss auf die Wirkung des zu testenden Materials, daher wurde die Oberfläche des Referenzpartikels gegenüber  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  angepasst. Somit entsprach die Fläche der  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  NP einer DQ12-Konzentration von 172  $\mu\text{g}$ .

Die Applizierung der CBNP- und Referenzsuspensionen mittels oropharyngealer Aspiration unter Isofluran-Narkose führten kurzzeitig zu einer erschwerten Atmung der Versuchstiere. Der Allgemeinzustand der Tiere wie z. B. das Körpergewicht wurden jedoch nicht nachhaltig beeinträchtigt (Daten nicht dargestellt).

Nach Ablauf der gewählten Partikelretentionszeiten erfolgte die Entnahme der Lungen zur histologischen Begutachtung, die Blutentnahme zur Plasmagewinnung, sowie die Entnahme der bronchoalveolären Lavage (BAL) und die Isolation der Surfactant synthetisierenden Typ II Pneumozyten. Auf Grund der teilweise sehr kurzen Zeitabstände zwischen Partikelaspiration und Probengewinnung wurde während der Zeitstudie auf die Prüfung der Lungenfunktion verzichtet.

### 4.2.1 Histologie

Bereits während der Lungenentnahme konnten zu allen Untersuchungszeitpunkten  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  induzierte Schwarzfärbungen der Lungen beobachtet werden, wohingegen die oropharyngealen Aspirationen der  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  Kontrolle bzw. des  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Referenzpartikels zu keinen sichtbaren Veränderungen führten.  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Quarz verursachte makroskopisch deutlich sichtbare Schädigungen des terminalen Respirationstraktes (nicht dargestellt).

#### 4.2.1.1 Veränderungen der Histologie des terminalen Respirationstraktes

Die Aspirationen von  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  bzw.  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  induzierten wie die  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle zu keinem Zeitpunkt strukturelle Veränderungen des terminalen Respirationstraktes. Dies ist anhand von Lungenschnitten  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  behandelter Tiere in Abb. 6 dargestellt. Des Weiteren konnten keine massiven Partikeldepositionen innerhalb des Gasaustauschbereiches beobachtet werden.

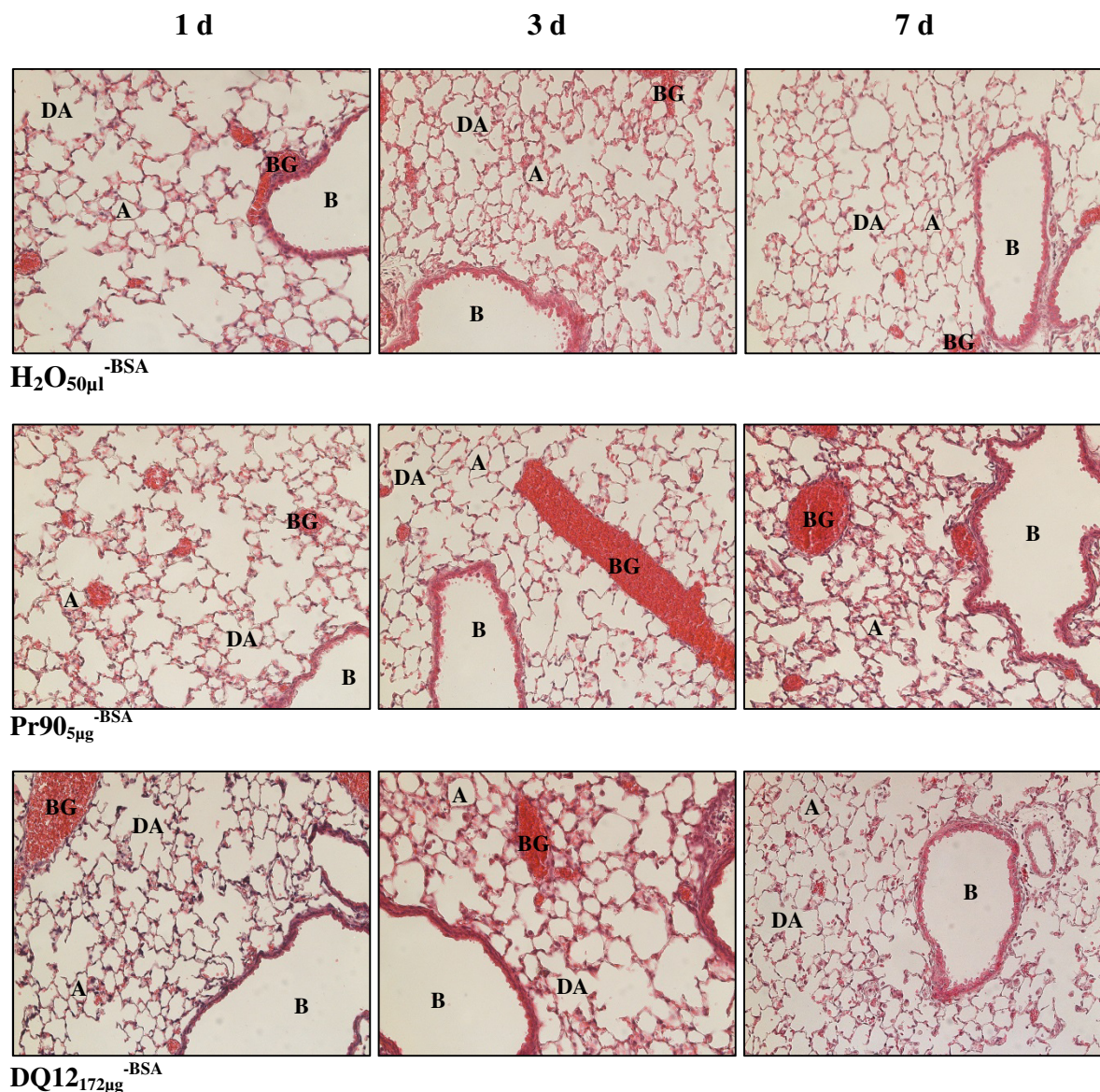


Abb. 6: Übersichtsaufnahmen H. E. gefärbter Lungenschnitte 1, 3 und 7 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}_{50\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200



#### 4.2.1.2 Mukussekretion der Becherzellen

Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) ermöglicht die Darstellung des Becherzellensekretes durch Färbung der darin enthaltenen Polysaccharide. Weder  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ , noch die Aspiration von  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  (Abb. 7) oder  $\text{H}_2\text{O}_{50\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  (nicht dargestellt) induzierten eine Mukushypersekretion nach 1, 3 und 7-tägiger Verweildauer in der Lunge.

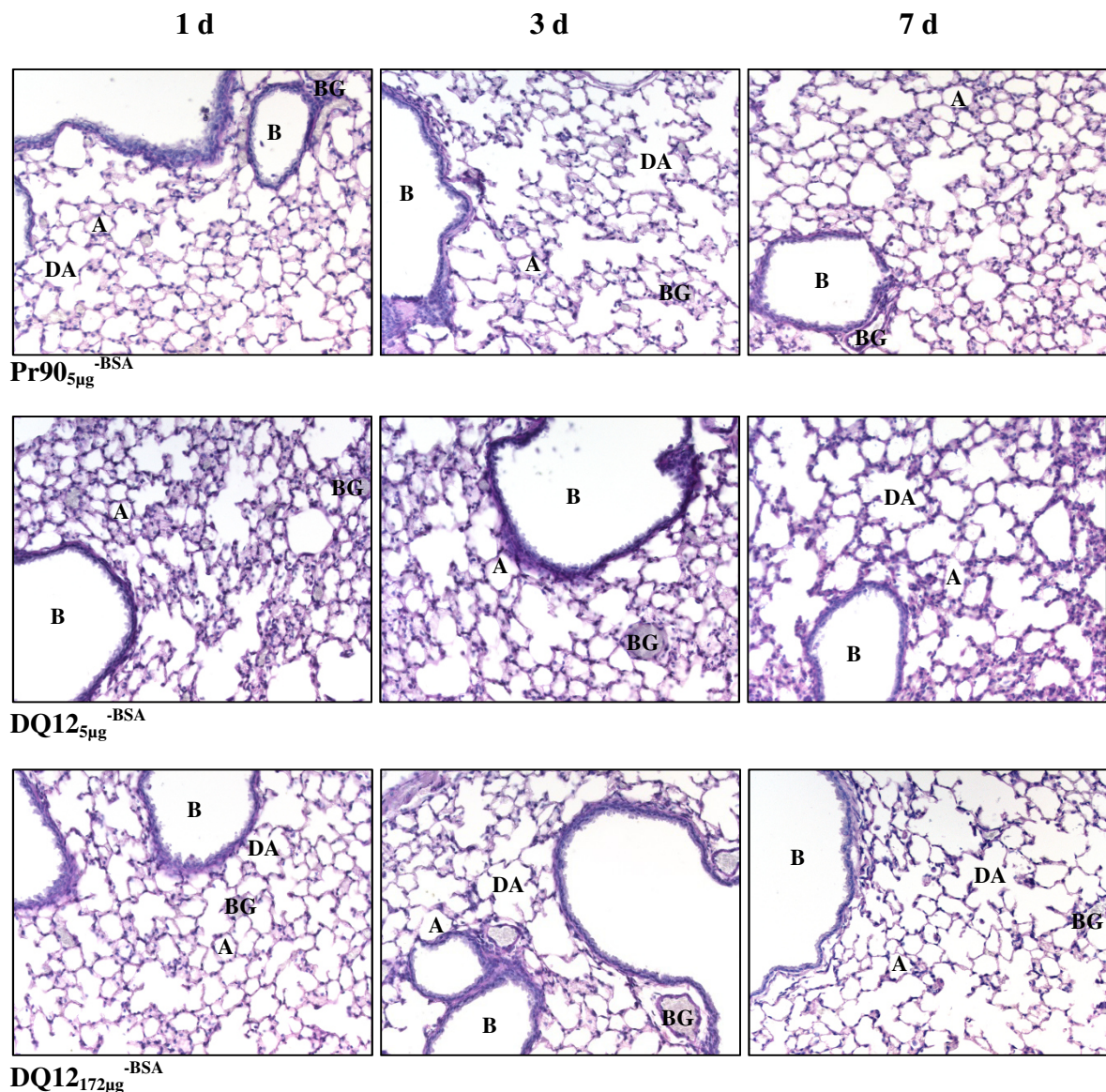


Abb. 7: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen PAS-Reaktion (rosa-violett) gefärbter Lungenschnitte 1, 3 und 7 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  ( $n = 2-3$ ); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200



#### 4.2.1.3 Kollagenexpression in der Lunge

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 8 zeigen vereinzelte kollagene Strukturen entlang der Blutgefäße und Bronchiolen nach CBNP und DQ12 Exposition. Die Lungenschnitte der  $\text{H}_2\text{O}_{50\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle (nicht dargestellt) sind vergleichbar mit denen der  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  behandelten Tiere.

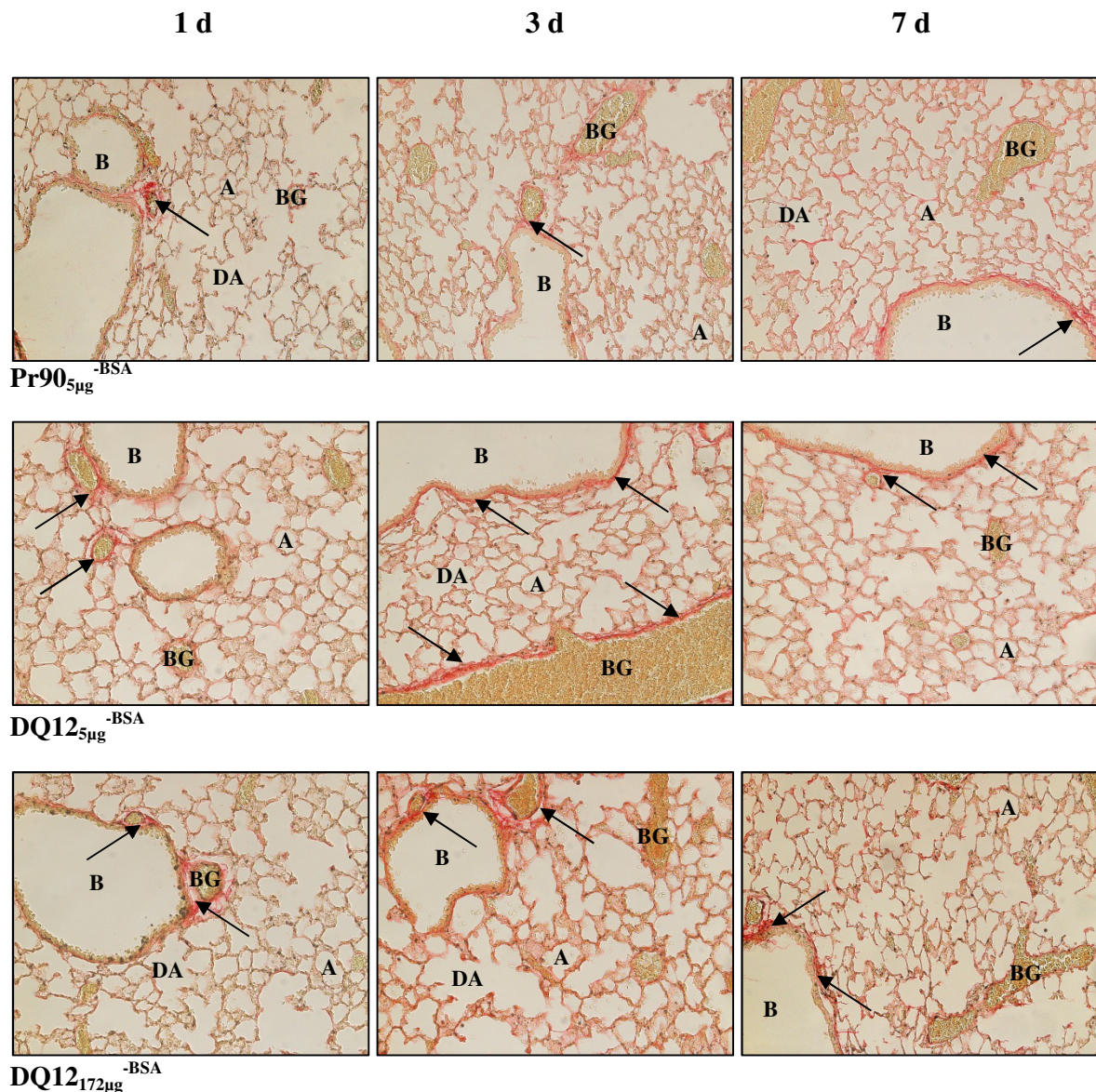


Abb. 8: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen Picrosirius Rot gefärbter Lungenschnitte 1, 3 und 7 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  ( $n = 2-3$ ); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Markierung kollagener Strukturen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x200

#### 4.2.1.4 Immunhistochemie

##### 4.2.1.4.1 Antioxidantien-Proteinexpression

Partikelinduzierter, oxidativer Stress in der Lunge wurde per immunhistochemischer Analyse folgender antioxidativ wirksamer Enzyme geprüft: Superoxiddismutase 1 und 2 (SOD1, SOD2), Glutathionreduktase (GR), Glutathionperoxidase 3 und 4 (GPX3, GPX4) und Katalase (KAT).

Die SOD1-Proteinexpression in Lungenschnitten  $\text{H}_2\text{O}_{50\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{172\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ -behandelter Tiere ist in Abb. 9 dargestellt. In allen Versuchsgruppen konnten zu allen Untersuchungszeitpunkten intensive SOD1-Proteinexpressionen im Bronchialepithel und in den Zellen der Alveolarsepten detektiert werden. Der Nachweis der anderen Enzyme zeigte vergleichbare Ergebnisse (nicht dargestellt).



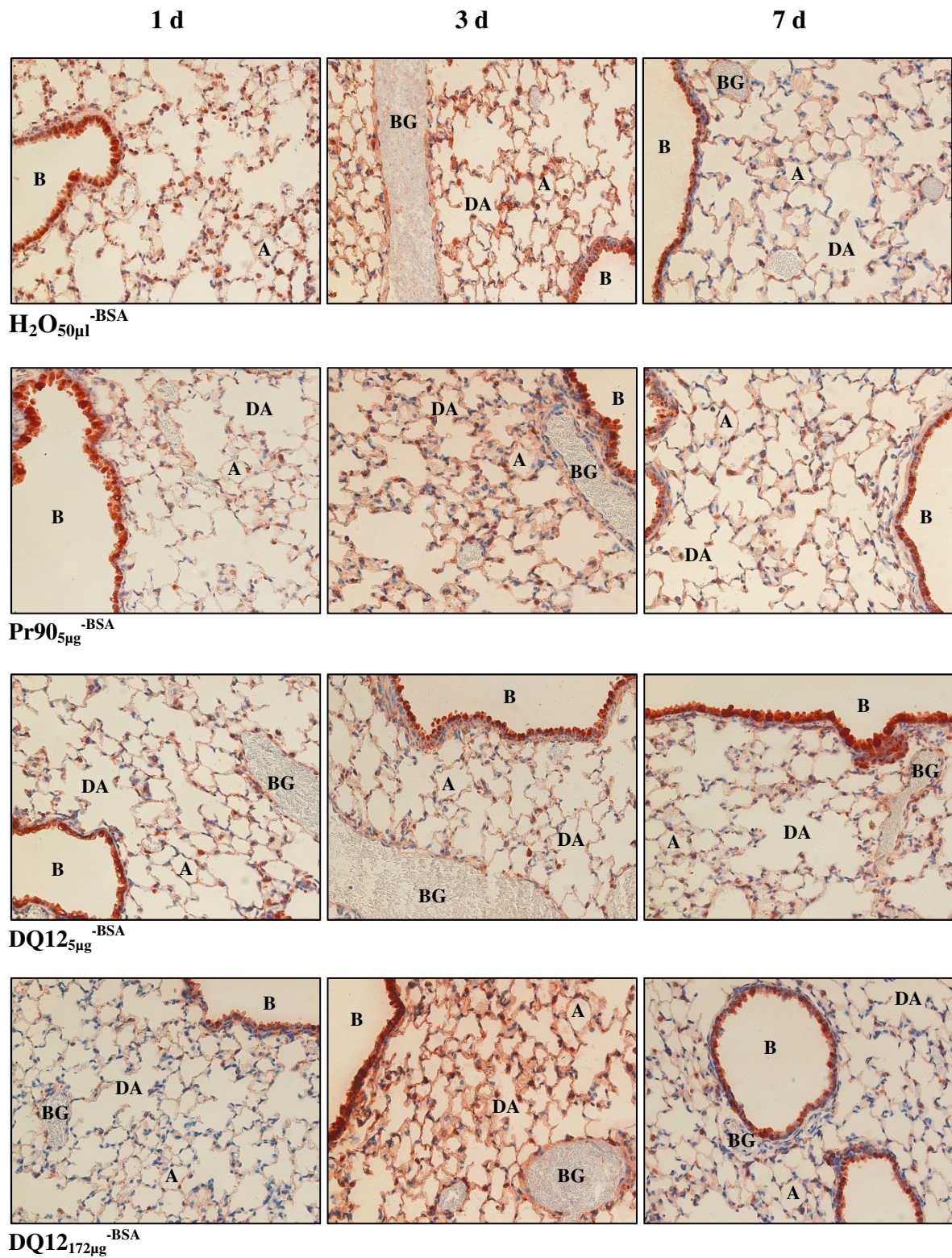


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der SOD1 (braun-rot) nach 1, 3 und 7-tägiger Verweildauer in der Lunge. Versuchstiergruppen: H<sub>2</sub>O<sub>50</sub>ul<sup>-BSA</sup>, Pr90<sub>5</sub>ug<sup>-BSA</sup>, DQ12<sub>5</sub>ug<sup>-BSA</sup> und DQ12<sub>172</sub>ug<sup>-BSA</sup> (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200

#### 4.2.2 IgE-Konzentration im Plasma

Die Erfassung der IgE-Konzentration im Plasma ergab bei der geringen Dosis von 5  $\mu\text{g}$  und kurzer Partikelretentionszeit keine CBNP-induzierten Veränderungen während der getesteten Untersuchungszeiträume (Tab. 11). Daher wurde auf den weiteren Nachweis der IgE-Konzentration im Plasma während der Kurzzeitexperimente verzichtet.

**Tab. 11: IgE-Konzentration im Plasma**

|   | IgE<br>[ng/ml]  |
|---|-----------------|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>50<math>\mu</math>l</sub>-BSA</b> |                 |
| 1 d   | 55,0 $\pm$ 6,6  |
| 3 d   | 64,0 $\pm$ 14,6 |
| 7 d   | 87,5 $\pm$ 26,5 |
| <b>Pr90<sub>5<math>\mu</math>g</sub>-BSA</b>            |                 |
| 1 d   | 49,4 $\pm$ 0,4  |
| 3 d   | 43,3 $\pm$ 11,1 |
| 7 d   | 55,4 $\pm$ 1,8  |
| <b>DQ12<sub>5<math>\mu</math>g</sub>-BSA</b>            |                 |
| 1 d   | 54,3 $\pm$ 5,1  |
| 3 d   | ND              |
| 7 d   | ND              |
| <b>DQ12<sub>172<math>\mu</math>g</sub>-BSA</b>          |                 |
| 1 d   | ND              |
| 3 d   | 55,1 $\pm$ 12,6 |
| 7 d   | 59,1 $\pm$ 2,7  |

Mittelwerte  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test:

\*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub>-BSA ( $p < 0,05$ );  
n = 2-3; ND - nicht durchgeführt



### 4.2.3 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage

Der Einfluss von CBNP auf die BAL-Zellpopulation wurde durch Anfertigung von Zytospinpräparaten und dem Auszählen von fünf repräsentativen Gesichtsfeldern näher betrachtet. Die Ergebnisse in Tab. 12 zeigen eine gesteigerte Gesamtzellzahl DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> behandelter Tiere an Tag 1 und 3, einen vermehrten Anteil von Makrophagen an Tag 7, sowie einen intensiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten zu allen drei Untersuchungszeitpunkten. Außerdem wurde nach Aspiration von DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> ein erhöhter Proteinanteil der BAL an Tag 1 und 3 nachgewiesen.

Die in Abb. 10 dargestellten Zytospinpräparate bestätigen eine intensive Phagozytose von CBNP bzw. DQ12 durch Makrophagen während der gesamten Untersuchungszeiträume. Präparate DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> behandelter Tiere heben sich außerdem durch eine stark erhöhten Anteil neutrophiler und eosinophiler Granulozyten von den anderen Zytospinpräparaten ab.

**Tab. 12: Zelldifferenzierung und Gesamtproteingehalt der BAL**

|  | <b>Gesamt-<br/>zellzahl</b> | <b>Makro-<br/>phagen</b> | <b>Neutro-<br/>phile</b> | <b>Lympho-<br/>zyten</b> | <b>Eosino-<br/>phile</b> | <b>Protein<br/>[µg/ml]</b> |
|--|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>50µl</sub></b> <sup>-BSA</sup> |                             |                          |                          |                          |                          |                            |
| <b>1 d</b>   | 38,4 ± 5,8                  | 35,7 ± 4,9               | 2,2 ± 1,3                | 0,5 ± 0,2                | 0,0 ± 0,0                | 192,5 ± 8,0                |
| <b>3 d</b>   | 45,9 ± 5,1                  | 40,9 ± 5,4               | 4,3 ± 3,7                | 0,5 ± 0,2                | 0,2 ± 0,1                | 160,6 ± 14,6               |
| <b>7 d</b>   | 27,2 ± 4,1                  | 26,9 ± 3,8               | 0,2 ± 0,0                | 0,4 ± 0,2                | 0,1 ± 0,1                | 161,9 ± 12,3               |
| <b>Pr90<sub>5µg</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |                             |                          |                          |                          |                          |                            |
| <b>1 d</b>   | 33,8 ± 3,6                  | 28,9 ± 3,8               | 4,9 ± 0,8                | 0,3 ± 0,1                | 0,0 ± 0,0                | 200,0 ± 15,1               |
| <b>3 d</b>   | 32,3 ± 4,3                  | 31,0 ± 4,2               | 1,0 ± 0,5                | 0,3 ± 0,1                | 0,0 ± 0,0                | 147,8 ± 6,9                |
| <b>7 d</b>   | 36,4 ± 6,8                  | 35,0 ± 6,5               | 0,5 ± 0,2                | 0,6 ± 0,2                | 0,1 ± 0,1                | 166,2 ± 8,4                |
| <b>DQ12<sub>5µg</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |                             |                          |                          |                          |                          |                            |
| <b>1 d</b>   | 44,1 ± 6,2                  | 42,0 ± 6,8               | 1,8 ± 0,8                | 0,2 ± 0,1                | 0,1 ± 0,1                | 177,6 ± 13,9               |
| <b>3 d</b>   | 38,5 ± 5,1                  | 37,9 ± 4,9               | 0,4 ± 0,2                | 0,2 ± 0,1                | 0,0 ± 0,0                | 165,2 ± 7,3                |
| <b>7 d</b>   | 31,3 ± 7,9                  | 30,0 ± 7,8               | 1,1 ± 0,4                | 0,1 ± 0,1                | 0,0 ± 0,0                | 151,3 ± 1,0                |
| <b>DQ12<sub>172µg</sub></b> <sup>-BSA</sup>          |                             |                          |                          |                          |                          |                            |
| <b>1 d</b>   | <b>118,9 ± 34,2*</b>        | 32,7 ± 6,3               | <b>86,2 ± 28,0*</b>      | 0,0 ± 0,0                | 0,0 ± 0,0                | <b>337,6 ± 47,0*</b>       |
| <b>3 d</b>   | 68,7 ± 16,4                 | 32,3 ± 2,4               | <b>34,8 ± 14,1*</b>      | 1,3 ± 0,8                | 0,3 ± 0,2                | <b>225,9 ± 14,9*</b>       |
| <b>7 d</b>   | <b>197,0 ± 18,0*</b>        | <b>140,0 ± 19,9*</b>     | <b>53,0 ± 6,6*</b>       | 3,0 ± 1,7                | 1,0 ± 1,0                | 167,4 ± 10,9               |

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Zelldifferenzierung der BAL-Zytospinpräparate erfolgte unter dem Mikroskop durch auszählen 5 repräsentativer Gesichtsfelder (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50µl</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); n = 3-6

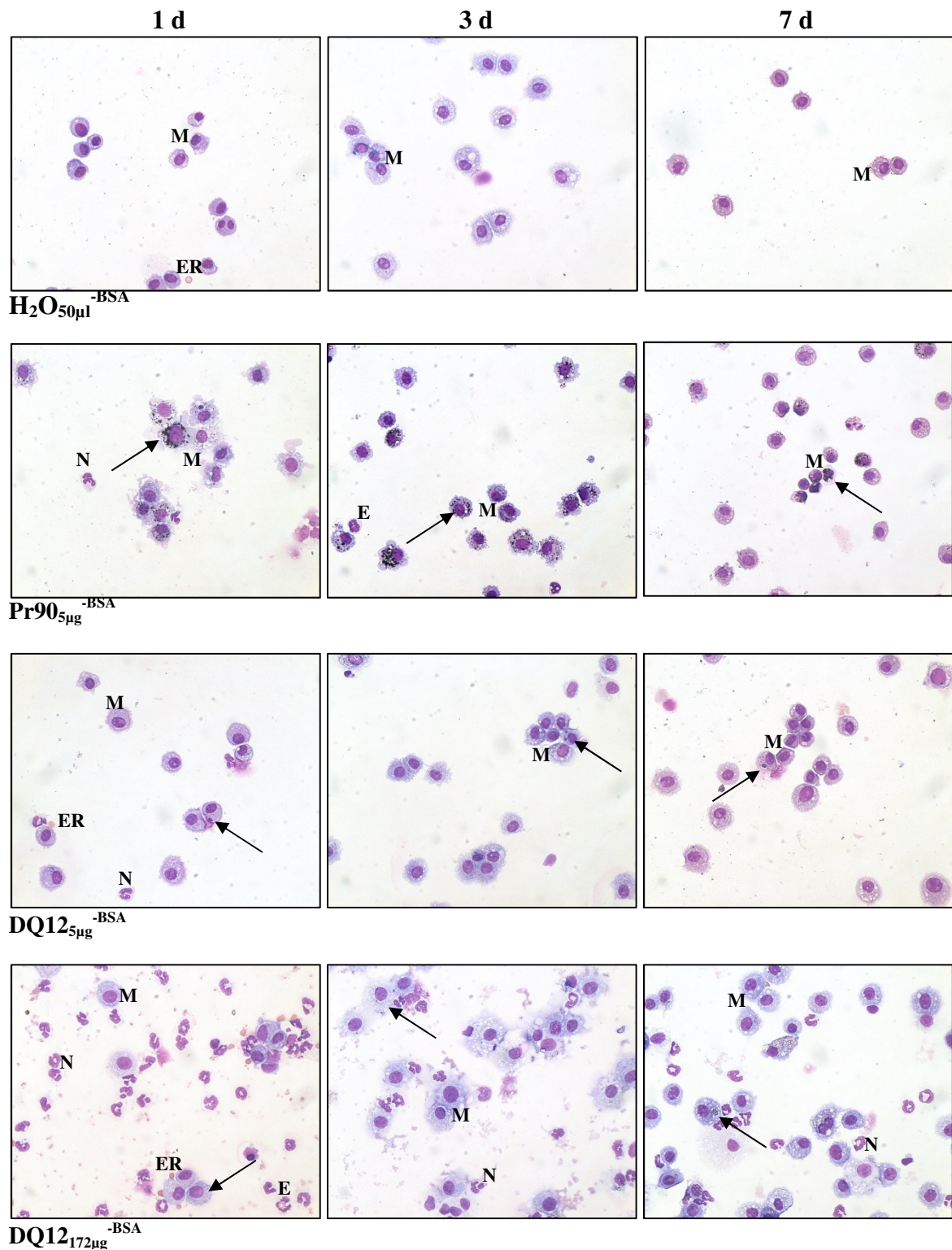


Abb. 10: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der BAL-Zytospinpräparate 1, 3 und 7 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen: H<sub>2</sub>O<sub>50µl</sub><sup>-BSA</sup>, Pr90<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup>, DQ12<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup> und DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> (n = 3-6); Abkürzungen: M - Makrophage, E - Eosiner Granulozyt, ER - Erythrozyt, N - Neutrophiler Granulozyt; May-Grünwald-Giemsa-Färbung; Markierung Partikel gefüllter Makrophagen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x400

#### 4.2.4 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten

Die standardisierte Isolation der Typ II Pneumozyten an Tag 1, 3 und 7 zeigte keine CBNP induzierten Effekte hinsichtlich Anzahl der gewonnenen Zellen und deren Proteingehalt. Lediglich DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> behandelte Tiere zeigten eine höhere Anzahl isolierter Typ II Pneumozyten gegenüber der Negativkontrolle (Tab. 13).

**Tab. 13: Zellausbeute und Gesamtproteingehalt**

|   | Isolierte<br>Typ II Pneumozyten                     | Proteinkonzentration pro<br>1 Million Zellen<br>[µg/ml] |
|---|---|---|
| <b>H<sub>2</sub>O</b> <sub>50µl</sub> <sup>-BSA</sup> |   |   |
| 1 d   | 5,7 x 10 <sup>6</sup> ± 9,8 x 10 <sup>5</sup>       | 419,7 ± 74,0  |
| 3 d   | 7,8 x 10 <sup>6</sup> ± 1,0 x 10 <sup>6</sup>       | 280,9 ± 21,7  |
| 7 d   | 5,8 x 10 <sup>6</sup> ± 5,1 x 10 <sup>5</sup>       | 242,6 ± 38,5  |
| <b>Pr90</b> <sub>5µg</sub> <sup>-BSA</sup>            |   |   |
| 1 d   | 4,8 x 10 <sup>6</sup> ± 1,1 x 10 <sup>6</sup>       | 532,2 ± 126,0   |
| 3 d   | 6,7 x 10 <sup>6</sup> ± 1,4 x 10 <sup>6</sup>       | 367,3 ± 101,1   |
| 7 d   | 6,6 x 10 <sup>6</sup> ± 7,6 x 10 <sup>5</sup>       | 295,5 ± 48,0  |
| <b>DQ12</b> <sub>5µg</sub> <sup>-BSA</sup>            |   |   |
| 1 d   | 3,5 x 10 <sup>6</sup> ± 1,5 x 10 <sup>6</sup>       | 584,6 ± 132,2   |
| 3 d   | 6,7 x 10 <sup>6</sup> ± 6,0 x 10 <sup>4</sup>       | 304,6 ± 12,5  |
| 7 d   | 6,4 x 10 <sup>6</sup> ± 4,6 x 10 <sup>5</sup>       | 271,8 ± 42,7  |
| <b>DQ12</b> <sub>172µg</sub> <sup>-BSA</sup>          |   |   |
| 1 d   | 7,8 x 10 <sup>6</sup> ± 2,2 x 10 <sup>5</sup>       | 359,7 ± 26,8  |
| 3 d   | 4,3 x 10 <sup>6</sup> ± 1,2 x 10 <sup>6</sup>       | 402,5 ± 183,2   |
| 7 d   | <b>1,1 x 10<sup>7</sup> ± 1,7 x 10<sup>6</sup>*</b> | 334,9 ± 59,1  |

Mittelwerte ± SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikant erhöht vs. H<sub>2</sub>O<sub>50µl</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); n = 8-9

#### 4.2.4.1 Antioxidantien und Zytokin mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten

Die mRNA-Expression verschiedener Antioxidantien, sowie des Zytokins IL-6 und dessen Rezeptor IL-6R $\alpha$  veränderten sich nach CBNP Aspiration kaum (Tab. 14 und 15).

Lediglich Pr90 $_{5\mu\text{g}}$ <sup>-BSA</sup> erhöhte die mRNA-Expression der extrazellulären Superoxid-dismutase (SOD3) nach 3-tägiger Partikel-exposition im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> Kontrolle, während DQ12<sub>172 $\mu$ g</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration eine deutlich verringerte KAT und IL-6 mRNA-Expression an Tag 3 und eine Verringerung der SOD3 mRNA-Expression an Tag 7 hervorrief.

**Tab. 14: mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten, Teil I**

|   | IL-6                                | IL-6R $\alpha$ |
|---|-------------------------------------|----------------|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>50<math>\mu</math>l</sub></b> <sup>-BSA</sup> |                                     |                |
| <b>1 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,1                       | 1,0 $\pm$ 0,2  |
| <b>3 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,1                       | 1,0 $\pm$ 0,1  |
| <b>7 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,2                       | 1,0 $\pm$ 0,2  |
| <b>Pr90<sub>5<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |                                     |                |
| <b>1 d</b>  | 0,9 $\pm$ 0,1                       | 0,6 $\pm$ 0,2  |
| <b>3 d</b>  | 1,7 $\pm$ 0,4                       | 1,7 $\pm$ 1,1  |
| <b>7 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,1                       | 1,6 $\pm$ 1,0  |
| <b>DQ12<sub>5<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |                                     |                |
| <b>1 d</b>  | ND                                  | ND             |
| <b>3 d</b>  | ND                                  | ND             |
| <b>7 d</b>  | ND                                  | ND             |
| <b>DQ12<sub>172<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>          |                                     |                |
| <b>1 d</b>  | 1,4 $\pm$ 0,5                       | 0,5 $\pm$ 0,2  |
| <b>3 d</b>  | <b>0,05 <math>\pm</math> 0,01</b> * | 0,3 $\pm$ 0,0  |
| <b>7 d</b>  | 1,1 $\pm$ 0,1                       | 0,5 $\pm$ 0,2  |

Darstellung der Ergebnisse als x-fache mRNA-Expressionsänderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); ND - nicht durchgeführt; n = 2-6

**Tab. 15: mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten, Teil II**

|   | SOD1          | SOD2          | SOD3                              | GR            | GPX3          | GPX4          | KAT                               |
|---|---------------|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>50<math>\mu</math>l</sub></b> <sup>-BSA</sup> |               |               |                                   |               |               |               |                                   |
| <b>1 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,2 | 1,0 $\pm$ 0,5                     | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,2 | 1,0 $\pm$ 0,5 | 1,0 $\pm$ 0,3                     |
| <b>3 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,3 | 1,0 $\pm$ 0,3                     | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,2 | 1,0 $\pm$ 0,2 | 1,0 $\pm$ 0,1                     |
| <b>7 d</b>  | 1,0 $\pm$ 0,0 | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,3                     | 1,0 $\pm$ 0,4 | 1,0 $\pm$ 0,1 | 1,0 $\pm$ 0,3 | 1,0 $\pm$ 0,3                     |
| <b>Pr90<sub>5<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |               |               |                                   |               |               |               |                                   |
| <b>1 d</b>  | 1,6 $\pm$ 0,4 | 2,8 $\pm$ 1,0 | 0,2 $\pm$ 0,1                     | 1,4 $\pm$ 0,4 | 1,9 $\pm$ 0,9 | 0,5 $\pm$ 0,1 | 1,3 $\pm$ 0,3                     |
| <b>3 d</b>  | 1,1 $\pm$ 0,3 | 0,4 $\pm$ 0,3 | <b>3,3 <math>\pm</math> 1,5</b> * | 2,7 $\pm$ 1,3 | 1,1 $\pm$ 0,4 | 2,7 $\pm$ 1,9 | 3,4 $\pm$ 1,9                     |
| <b>7 d</b>  | 1,1 $\pm$ 0,2 | 1,3 $\pm$ 0,3 | 1,7 $\pm$ 0,7                     | 0,5 $\pm$ 0,3 | 1,0 $\pm$ 0,4 | 2,4 $\pm$ 1,1 | 0,8 $\pm$ 0,4                     |
| <b>DQ12<sub>5<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>            |               |               |                                   |               |               |               |                                   |
| <b>1 d</b>  | ND            | 1,3 $\pm$ 1,0 | ND                                | 0,9 $\pm$ 0,2 | 0,6 $\pm$ 0,0 | 0,5 $\pm$ 0,1 | 1,2 $\pm$ 0,2                     |
| <b>3 d</b>  | ND            | 0,6 $\pm$ 0,0 | ND                                | 1,2 $\pm$ 0,6 | 3,2 $\pm$ 1,7 | 0,5 $\pm$ 0,0 | 0,7 $\pm$ 0,5                     |
| <b>7 d</b>  | ND            | 1,4 $\pm$ 1,0 | ND                                | 0,9 $\pm$ 0,7 | 1,3 $\pm$ 0,9 | 1,3 $\pm$ 0,6 | 1,4 $\pm$ 1,3                     |
| <b>DQ12<sub>172<math>\mu</math>g</sub></b> <sup>-BSA</sup>          |               |               |                                   |               |               |               |                                   |
| <b>1 d</b>  | 1,3 $\pm$ 0,1 | 3,0 $\pm$ 1,1 | 0,2 $\pm$ 0,1                     | 3,1 $\pm$ 0,8 | 4,4 $\pm$ 2,2 | 0,8 $\pm$ 0,3 | 3,4 $\pm$ 1,7                     |
| <b>3 d</b>  | 0,6 $\pm$ 0,2 | 1,1 $\pm$ 0,6 | 2,9 $\pm$ 2,4                     | 1,2 $\pm$ 0,9 | 3,0 $\pm$ 1,9 | 1,1 $\pm$ 0,6 | <b>0,5 <math>\pm</math> 0,1</b> * |
| <b>7 d</b>  | 1,5 $\pm$ 0,0 | 2,0 $\pm$ 0,6 | <b>0,2 <math>\pm</math> 0,1</b> * | 0,4 $\pm$ 0,1 | 2,6 $\pm$ 1,6 | 0,3 $\pm$ 0,1 | 0,3 $\pm$ 0,1                     |

Darstellung der Ergebnisse als x-fache mRNA-Expressionsänderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sub>50 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); ND - nicht durchgeführt; n = 2-8

### 4.3 Toxizitätsvergleich oberflächenfunktionalisierter Carbon Black Nanopartikel nach akuter Exposition

Da eine eintägige Partikelverweildauer keine Messung der Lungenfunktion erlaubte und um akute Effekte zeitnah nachweisen zu können wurde nach Abschluss der Zeitstudie die Toxizität der einzelnen CBNP-Oberflächenfunktionalisierungen an Tag 3 vergleichend geprüft. Zusätzlich wurde die Partikelkonzentration in Absprache mit den anderen Arbeitsgruppen des Verbundprojektes zur besseren Vergleichbarkeit von 5 auf 7  $\mu\text{g}$  angehoben.

Für den Versuch wurden je  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und verschiedene oberflächenfunktionalisierte CBNP ( $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ) appliziert und mit dem  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Referenzpartikel und der  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle verglichen. Ähnlich wie für die Partikeloberfläche von DQ12 wurde für PAK-AR die Oberfläche durch Anhebung der Konzentration von 7 auf 15  $\mu\text{g}$  ( $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ) gegenüber  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  angeglichen. Da sich die Herstellung stabiler Partikelsuspensionen nur mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$  umsetzen lies wurden diese ebenfalls in den Versuch einbezogen.

### 4.3.1 Einfluss der CBNP auf die Lungenfunktion

Der Vergleich der Lungenfunktion nach 2-tägiger Partikelretentionszeit zeigte eine massive Einschränkung der Funktion nach Aspiration von  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  im Vergleich zur  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle (Abb. 11). Eine ähnlich starke, jedoch nicht signifikante Lungenfunktionseinschränkung wurde durch die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  erreicht.

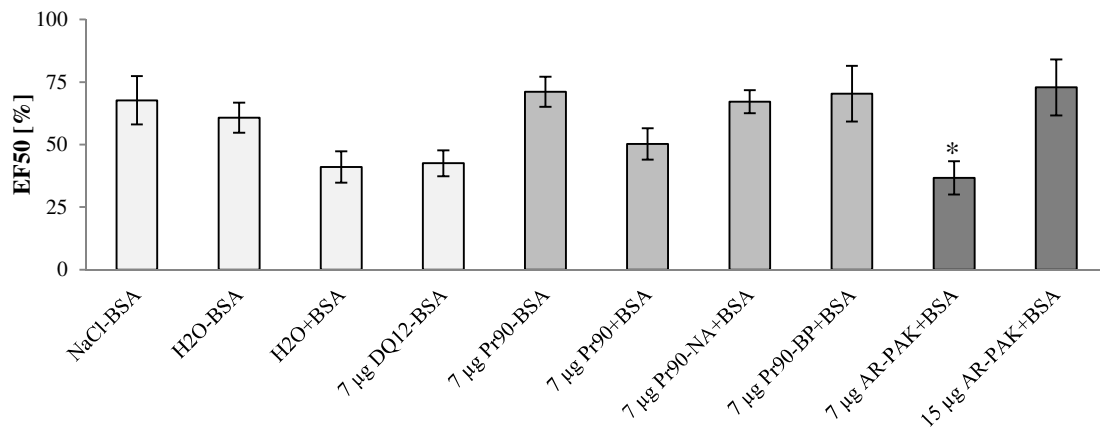


Abb. 11: Lungenfunktion nach 2-tägiger Probenaspiration (n = 6-20). Expiratorischer Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen (EF50 [%]). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs.  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  (p < 0,05)

### 4.3.2 Histologie

#### 4.3.2.1 Veränderungen der Histologie des terminalen Respirationstraktes

Die Applikationen oberflächenfunktionalisierter CBNP und die Aspiration von PAK-AR<sub>15μg</sub><sup>+BSA</sup> führten nach 3-tägiger Partikelretentionszeit zu keinen strukturellen Veränderungen der Lunge. Dies ist anhand repräsentativer Aufnahmen Pr90<sub>7μg</sub><sup>-BSA</sup>, NA-Pr90<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup>, PAK-AR<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup> und PAK-AR<sub>15μg</sub><sup>+BSA</sup> behandelter Tiere in Abb. 12 dargestellt. Durch die Applizierung von Partikeln, insbesondere durch PAK-AR<sub>15μg</sub><sup>+BSA</sup>, kam es lediglich zur Einwanderung von Makrophagen, welche vorrangig in der Nähe von Bronchiolen und Blutgefäßen vorzufinden waren.

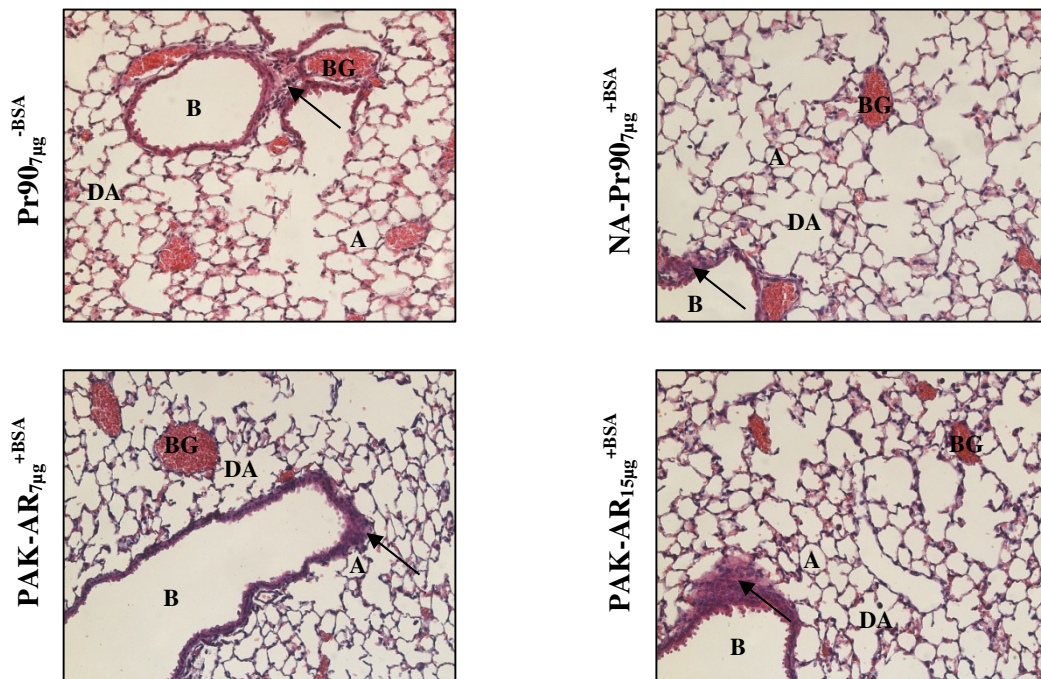


Abb. 12: Übersichtsaufnahmen H. E. gefärbter Lungenschnitte 3 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen: Pr90<sub>7μg</sub><sup>-BSA</sup>, NA-Pr90<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup>, PAK-AR<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup>, PAK-AR<sub>15μg</sub><sup>+BSA</sup> (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Markierung der Makrophageninfiltration durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x200



#### 4.3.2.2 Mukussekretion der Becherzellen

Die PAS gefärbten Lungenschnitte Partikel behandelter Tiere zeigten in den Becherzellen der Bronchiolen keine Veränderung der Mukussekretion. Repräsentative Lungenschnitte  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  bzw.  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  behandelte Tiere sind in Abb. 13 dargestellt.

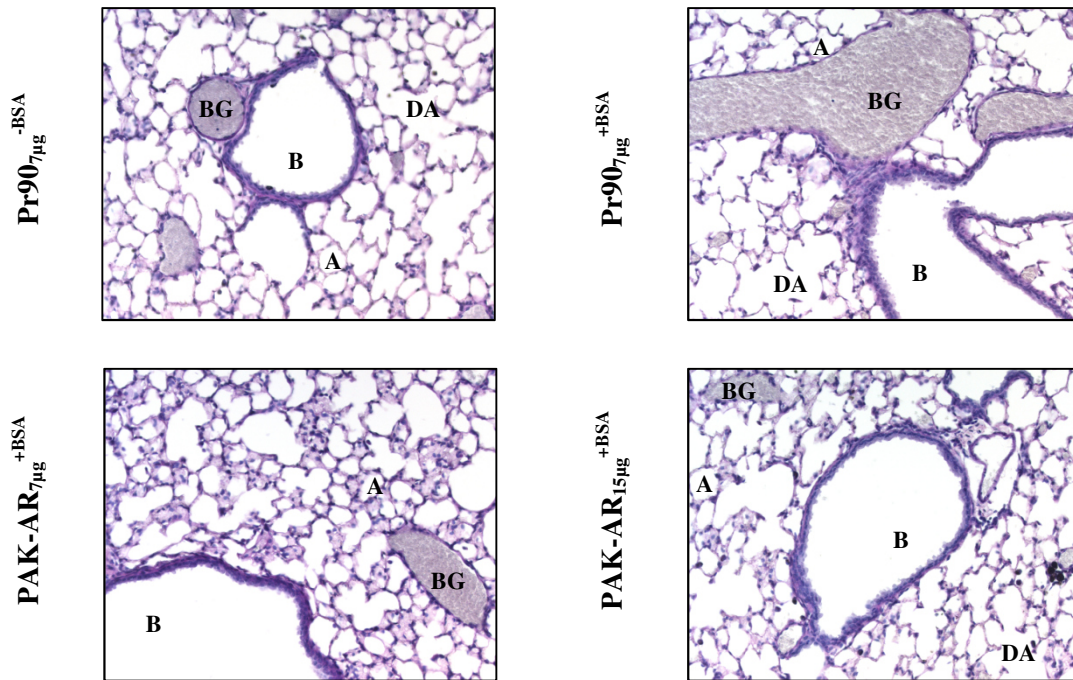


Abb. 13: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen PAS-Reaktion gefärbter Lungenschnitte 3 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  ( $n = 2-3$ ); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200



#### 4.3.2.3 Kollagenexpression in der Lunge

Weder die Veränderung der CBNP-Oberfläche noch die Erhöhung der Rußpartikelkonzentration verursachte verstärkte Kollageneinlagerungen im Epithel des Gasaustauschbereichs der Lunge. Repräsentative licht-mikroskopische Aufnahmen  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  behandelter Tiere in Abb. 14 bestätigen lediglich vereinzelte Kollagenstrukturen entlang der Blutgefäße und Bronchiolen. Die Lungenschnitte der nicht dargestellten Versuchstiergruppen zeigten ähnliche Ergebnisse wie die  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  behandelten Tiere.

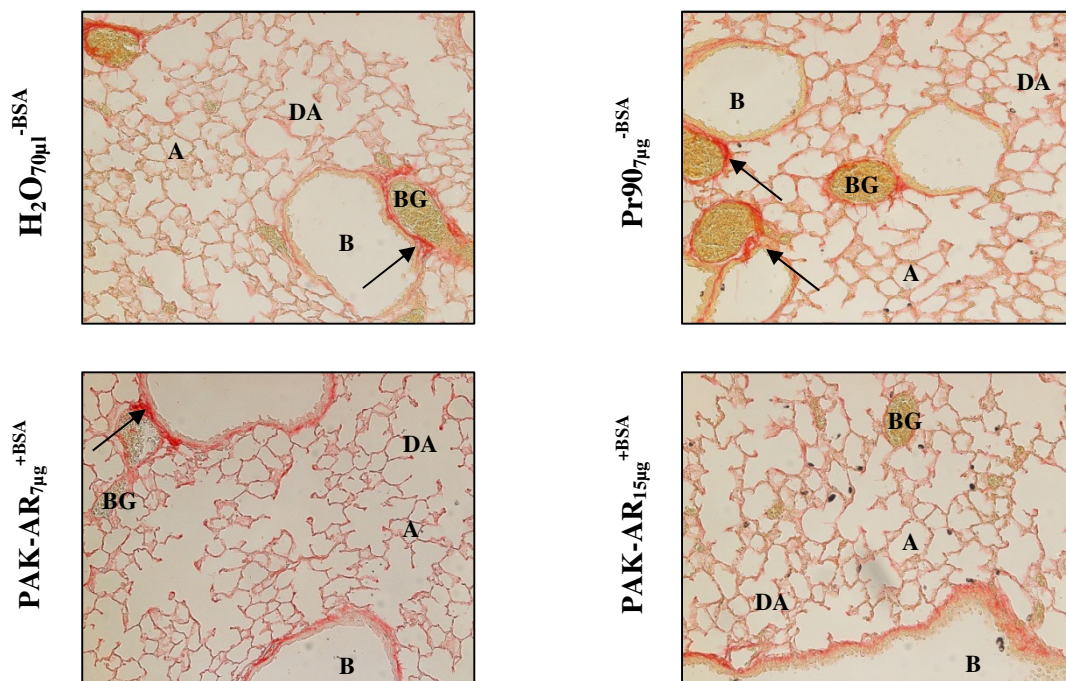
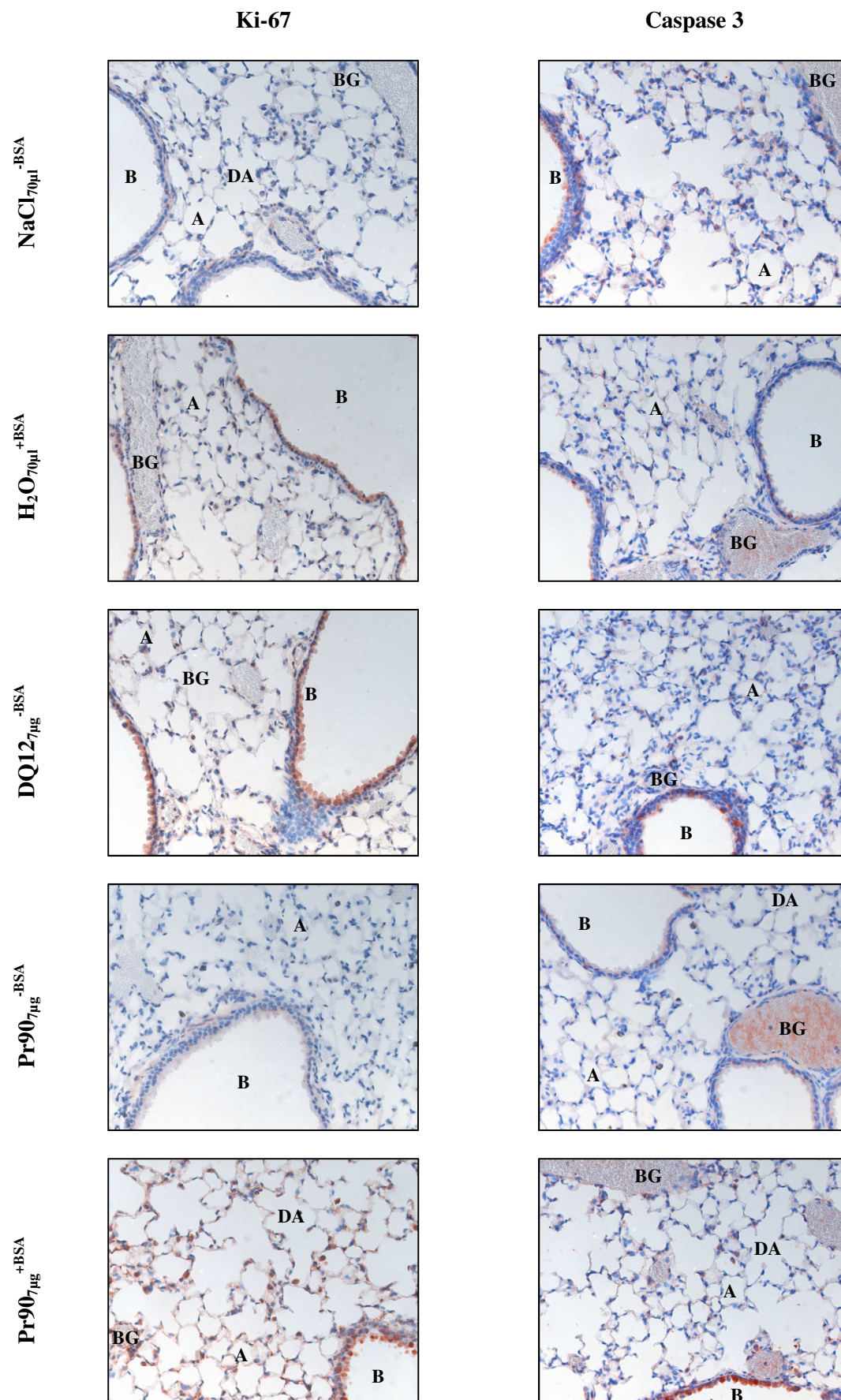


Abb. 14: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen Picrosirius Rot gefärbter Lungenschnitte 3 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Markierung kollagener Strukturen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x200

#### 4.3.2.4 Immunhistochemie

##### 4.3.2.4.1 Proliferations- und Zelltod-Analyse

Durch die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  (Abb. 15) zeigte sich eine leicht erhöhte Proliferation des Bronchialepithels, während die Behandlungen mit  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  zusätzlich zu einer verstärkten Proliferation in den Zellen der Alveolarsepten führte.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  zeigten wie die  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Kontrolle und die Lungenschnitte der  $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  behandelten Tiere keine veränderte Zellproliferation (z. T. nicht dargestellt). Bei allen Versuchstiergruppen zeigten sich vereinzelt Caspase 3 positiv markierte Zellen des Bronchialepithels und z. T. markierte Erythrozyten innerhalb der Blutgefäße. Insbesondere nach  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Exposition konnten verstärkt positiv markierte Zellen des Bronchialepithels nachgewiesen werden. Ausgewählte Beispiele Caspase 3 behandelter Lungenschnitte befinden sich in Abb. 15.





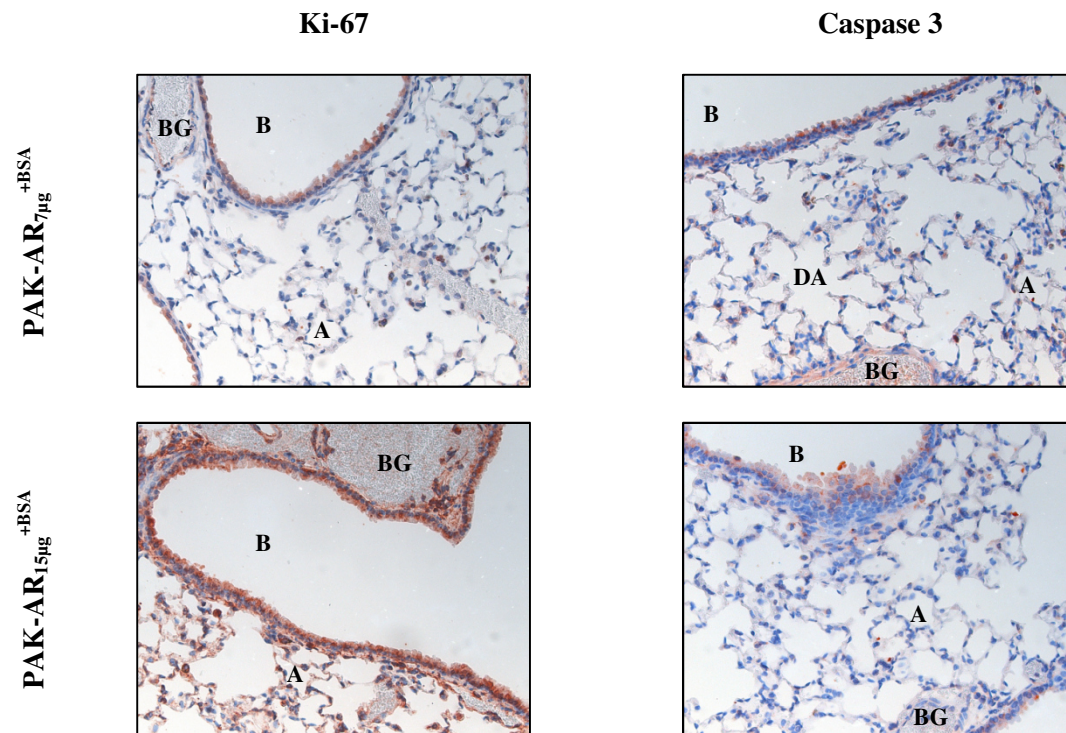
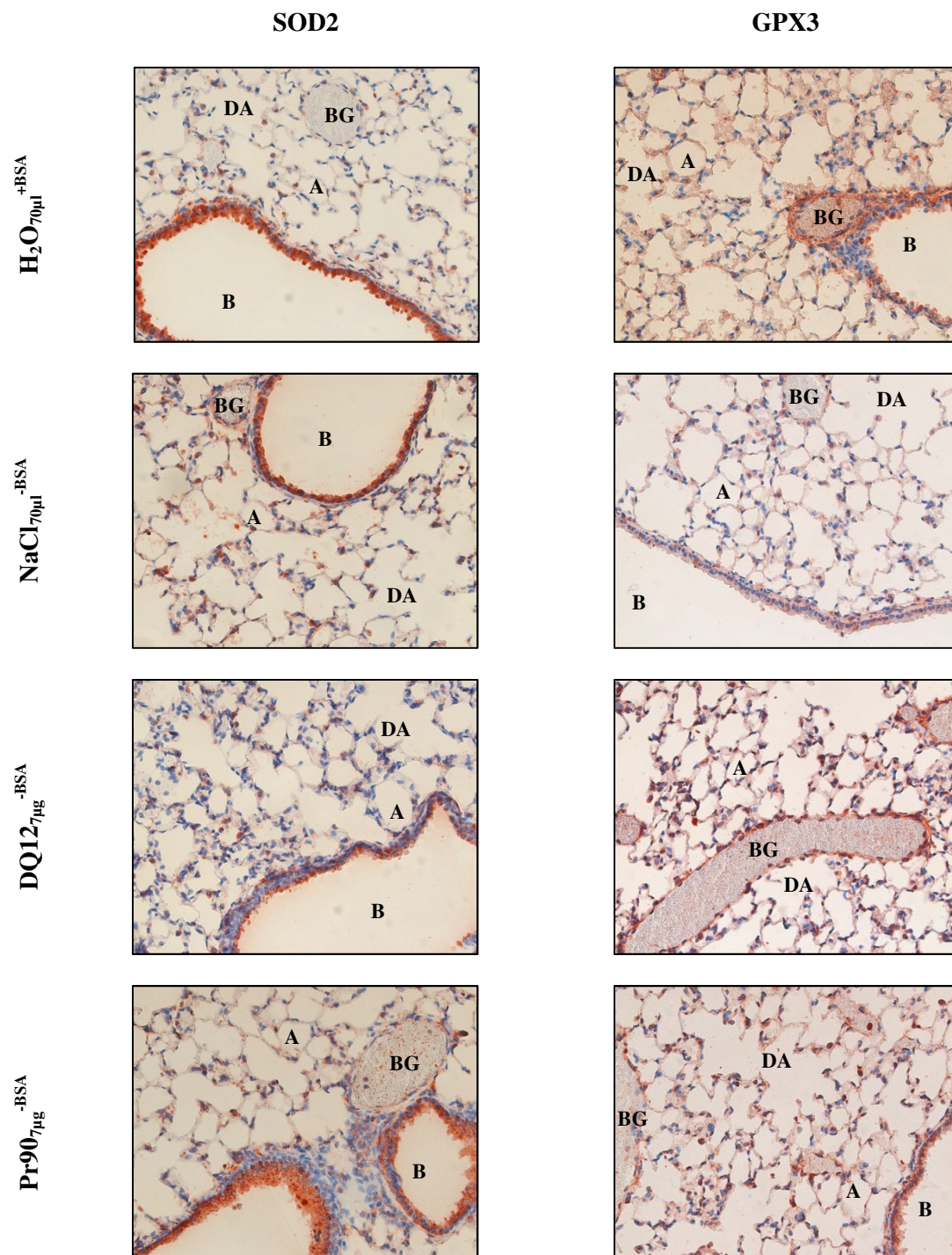


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 (links) und Caspase 3 (rechts) nach 3-tägiger Verweildauer in der Lunge (braun-rot). Versuchstiergruppen: NaCl<sub>70μl</sub><sup>-BSA</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>70μl</sub><sup>+BSA</sup>, DQ12<sub>7μg</sub><sup>-BSA</sup>, Pr90<sub>7μg</sub><sup>-BSA</sup>, Pr90<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup>, PAK-AR<sub>7μg</sub><sup>+BSA</sup> und PAK-AR<sub>15μg</sub><sup>+BSA</sup> (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200

#### **4.3.2.4.2 Antioxidantien-Proteinexpression**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch folgende Enzyme getestet: Superoxiddismutasen, Glutathionperoxidasen, die Glutathionreduktase und die Katalase. In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Mangan-Superoxiddismutase- (SOD2) und Glutathionperoxidase-Markierung (GPX3) anhand ausgewählter Versuchstiergruppen dargestellt. Durch die Applizierung oberflächenfunktionalisierter Printex<sup>®</sup> 90 CBNP und den PAK funktionalisierten Acetylenruß NP kam es zu einer intensiven Expression beider Enzyme innerhalb des Bronchialepithels und z. T. in einzelnen Zellen der Alveolarsepten. Allerdings konnten nach Aspiration des Referenzpartikels bzw. nach Verabreichung der Negativkontrollen ähnliche Effekte beobachtet werden. Der immunhistochemische Nachweis von SOD1, GPX4, GR und KAT zeigte ähnliche Ergebnisse (nicht dargestellt).





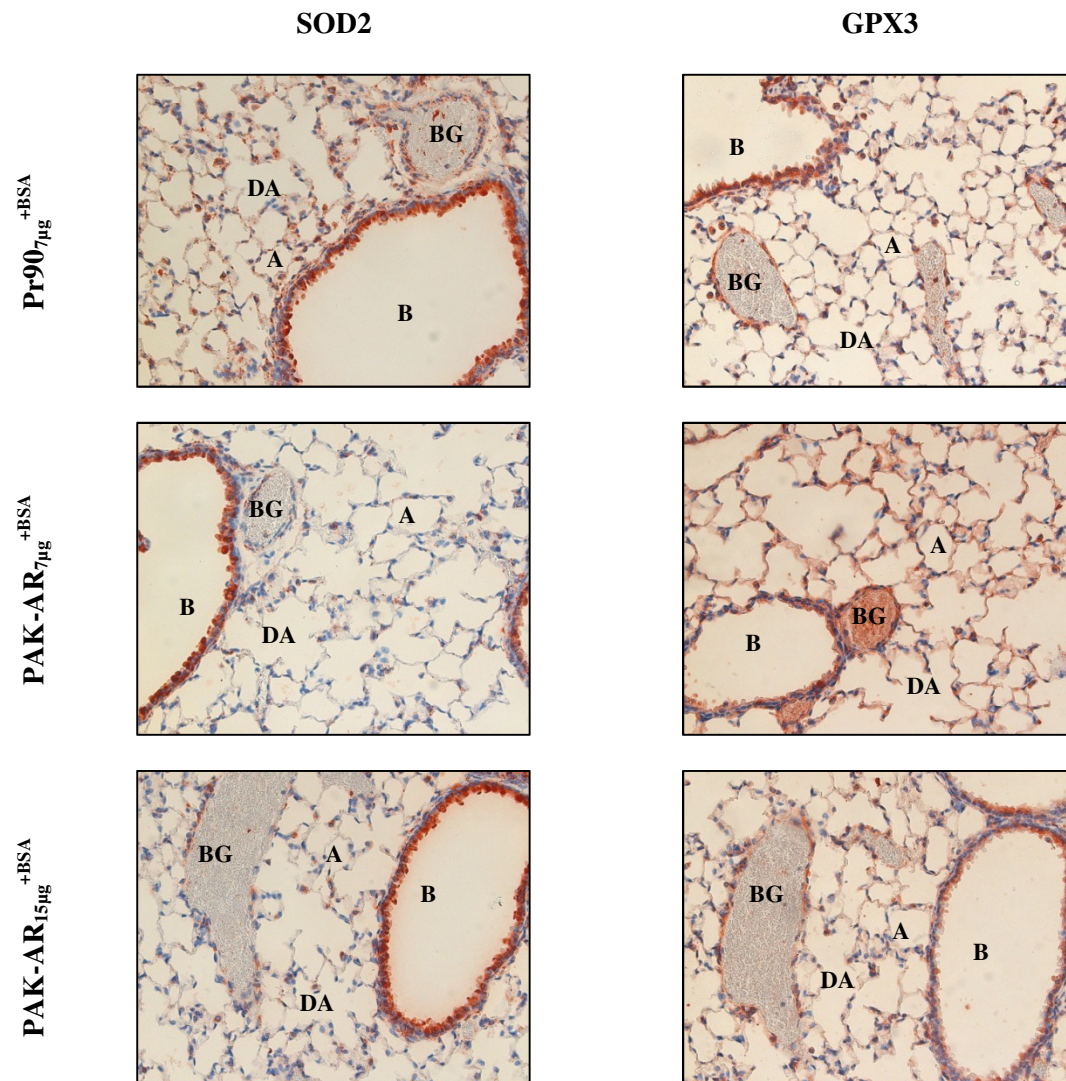


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis der SOD2 (links) und GPX3 (rechts) nach 3-tägiger Verweildauer in der Lunge (braun-rot). Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200

### 4.3.3 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage

Die Erfassung der BAL-Zellpopulation zeigte eine Verringerung der Gesamtzellzahl durch einen verringerten Anteil von Makrophagen nach  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Aspiration und Verringerungen des Lymphozytenanteils durch  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Applikation. Eine detaillierte Auflistung der zellulären Zusammensetzung befindet sich in Tab. 16.

**Tab. 16: Zelldifferenzierung der BAL**

|  | <b>Gesamt-<br/>zellzahl</b>        | <b>Makro-<br/>phagen</b>           | <b>Neutro-<br/>phile</b> | <b>Lympho-<br/>zyten</b>          | <b>Eosino-<br/>phile</b> |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$        | $52,8 \pm 4,9$                     | $51,5 \pm 4,7$                     | $0,8 \pm 0,3$            | $0,5 \pm 0,1$                     | $0,0 \pm 0,0$            |
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ | $46,4 \pm 3,5$                     | $44,7 \pm 3,6$                     | $1,4 \pm 0,5$            | $0,2 \pm 0,1$                     | $0,1 \pm 0,1$            |
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ | $56,7 \pm 7,2$                     | $55,9 \pm 7,3$                     | $0,7 \pm 0,2$            | $0,2 \pm 0,1$                     | $0,1 \pm 0,1$            |
| $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | $52,9 \pm 6,7$                     | $51,0 \pm 6,4$                     | $1,1 \pm 0,3$            | $0,5 \pm 0,1$                     | $0,2 \pm 0,1$            |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | <b><math>39,4 \pm 2,8^*</math></b> | <b><math>37,7 \pm 2,7^*</math></b> | $0,8 \pm 0,3$            | $0,5 \pm 0,1$                     | $0,4 \pm 0,2$            |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$         | $59,4 \pm 7,8$                     | $58,8 \pm 7,6$                     | $0,4 \pm 0,2$            | <b><math>0,1 \pm 0,0^*</math></b> | $0,2 \pm 0,1$            |
| $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | $51,4 \pm 5,7$                     | $51,1 \pm 5,8$                     | $0,1 \pm 0,1$            | $0,2 \pm 0,1$                     | $0,1 \pm 0,1$            |
| $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$     | $53,2 \pm 4,7$                     | $52,6 \pm 4,7$                     | $0,3 \pm 0,1$            | <b><math>0,1 \pm 0,0^*</math></b> | $0,1 \pm 0,0$            |
| $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$       | $70,6 \pm 7,0$                     | $68,4 \pm 6,9$                     | $1,9 \pm 0,9$            | $0,4 \pm 0,1$                     | $0,2 \pm 0,1$            |
| $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | $49,5 \pm 5,9$                     | $47,2 \pm 5,6$                     | $1,7 \pm 0,8$            | $0,6 \pm 0,2$                     | $0,0 \pm 0,0$            |

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Zelldifferenzierung der BAL-Zytospinpräparate erfolgte unter dem Mikroskop durch auszählen 5 repräsentativer Gesichtsfelder (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikant reduziert vs.  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  ( $p < 0,05$ );  $n = 6-20$



Die in Abb. 18 dargestellten BAL-Zytospinpräparate zeigen Makrophagen mit inkorporierten CBNP bzw. Referenzpartikeln. Die Präparate  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  behandelter Tiere (nicht dargestellt) zeigten vergleichbare Ergebnisse.

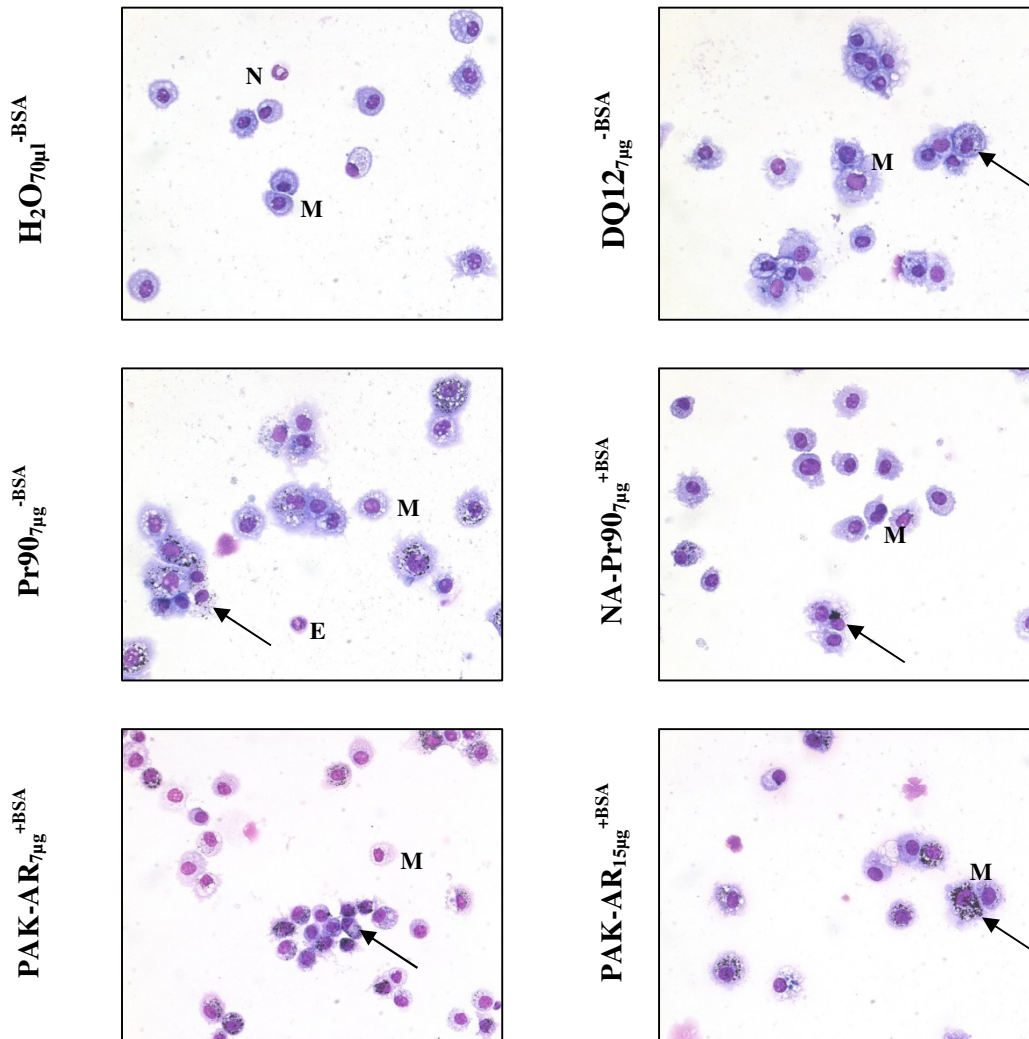


Abb. 18: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der BAL-Zytospinpräparate 3 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  ( $n=6-20$ ); Abkürzungen: M - Makrophage, E - Eosiner Granulozyt, ER - Erythrozyt, N - Neutrophiler Granulozyt; May-Grünwald-Giemsa-Färbung; Markierung Partikel gefüllter Makrophagen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x400

Die in Tab. 17 gelisteten BAL-Parameter zeigen, dass keiner der getesteten CBNP Auswirkungen auf den Protein- und Phospholipidanteil in der BAL hatten. LDH-Konzentrationen und die antioxidative Kapazität (Trolox-Äquivalent) blieben ebenfalls unverändert. Da die identische antioxidative Kapazität auch auf Grund der Störanfälligkeit der sehr sensiblen Messmethode beruhen kann wurde bei allen weiteren Experimenten auf die Messung dieses BAL-Parameters verzichtet.

**Tab. 17: Parameter der BAL**

|   | <b>Protein<br/>[µg/ml]</b> | <b>Phospholipid<br/>[µg/ml]</b> | <b>LDH<br/>[U/L]</b> | <b>Trolox-Äquivalent<br/>[µM]</b> |
|---|----------------------------|---------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <b>NaCl<sub>70µl</sub><sup>-BSA</sup></b>           | 182,0 ± 24,3               | 94,1 ± 4,7                      | 4,0 ± 1,1            | 202,4 ± 10,2                      |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>70µl</sub><sup>-BSA</sup></b> | 184,0 ± 14,3               | 109,7 ± 8,0                     | 2,9 ± 0,6            | 215,7 ± 10,1                      |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>70µl</sub><sup>+BSA</sup></b> | 175,6 ± 15,8               | 115,3 ± 7,5                     | 1,8 ± 0,5            | ND                                |
| <b>DQ12<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup></b>            | 196,9 ± 14,7               | 96,4 ± 8,4                      | 4,3 ± 0,7            | 197,3 ± 15,3                      |
| <b>Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup></b>            | 205,7 ± 14,8               | 96,6 ± 9,4                      | 4,4 ± 0,9            | 204,5 ± 5,5                       |
| <b>Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup></b>            | 188,1 ± 22,8               | 75,2 ± 7,2                      | ND                   | ND                                |
| <b>NA-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup></b>         | 130,6 ± 26,2               | 102,5 ± 14,2                    | ND                   | ND                                |
| <b>BaP-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup></b>        | 172,4 ± 24,1               | 98,3 ± 4,5                      | ND                   | ND                                |
| <b>PAK-AR<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup></b>          | 206,5 ± 11,9               | 116,8 ± 11,8                    | 1,4 ± 0,4            | ND                                |
| <b>PAK-AR<sub>15µg</sub><sup>+BSA</sup></b>         | 192,4 ± 15,3               | 89,2 ± 7,1                      | ND                   | ND                                |

Mittelwerte ± SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. NaCl<sub>70µl</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); ND - nicht durchgeführt; n = 6-20

#### 4.3.4 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten

Die Anzahl der isolierbaren Zellen wurde durch PAK-AR<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup> und PAK-AR<sub>15µg</sub><sup>+BSA</sup> Aspiration im Vergleich zur NaCl<sub>70µl</sub><sup>-BSA</sup> Kontrolle erhöht, während alle weiteren funktionalisierten CBNP und der Referenzpartikel keine Veränderung der Zellausbeute induzierten. Die Proteinkonzentration der Typ II Pneumozyten nahm lediglich durch Applikation des Referenzpartikels massiv ab bzw. durch Aspiration von NA-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup> stark zu (Tab. 18).

**Tab. 18: Zellausbeute und Gesamtproteingehalt**

|  | Isolierte<br>Typ II Pneumozyten                           | Proteinkonzentration pro<br>1 Million Zellen<br>[µg/ml] |
|--|---|---|
| NaCl <sub>70µl</sub> <sup>-BSA</sup>             | $4,8 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^5$                     | $573,7 \pm 75,8$  |
| H <sub>2</sub> O <sub>70µl</sub> <sup>-BSA</sup> | $6,4 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^5$                     | $482,9 \pm 42,8$  |
| H <sub>2</sub> O <sub>70µl</sub> <sup>+BSA</sup> | $6,4 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^5$                     | $532,0 \pm 46,1$  |
| DQ12 <sub>7µg</sub> <sup>-BSA</sup>              | $7,4 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$                     | <b><math>375,1 \pm 43,6^*</math></b>                    |
| Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>-BSA</sup>              | $5,3 \times 10^6 \pm 5,0 \times 10^5$                     | $671,4 \pm 73,5$  |
| Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>              | $4,2 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$                     | $726,9 \pm 60,5$  |
| NA-Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>           | $4,4 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^5$                     | <b><math>925,9 \pm 102,5^*</math></b>                   |
| BaP-Pr90 <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>          | $6,6 \times 10^6 \pm 8,1 \times 10^5$                     | $591,4 \pm 46,3$  |
| PAK-AR <sub>7µg</sub> <sup>+BSA</sup>            | <b><math>7,8 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^5^*</math></b> | $478,6 \pm 34,5$  |
| PAK-AR <sub>15µg</sub> <sup>+BSA</sup>           | <b><math>6,7 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^5^*</math></b> | $798,2 \pm 113,9$                                       |

Mittelwerte  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. NaCl<sub>70µl</sub><sup>-BSA</sup> (p < 0,05); n = 6-20

#### 4.3.4.1 Antioxidantien-Proteinexpression in Typ II Pneumozyten

Die SOD2- und GPX3-Proteinexpression in Typ II Pneumozyten ließ sich per Western Blot nicht erfassen, da die intensive Bindung von Proteinen an die Partikeloberfläche während der Exposition, sowie ungewünschte Interaktionen während der Aufreinigung und Zwischenlagerung der Zellproteine vorkommen und somit zu uneinheitlichen Ergebnisse führen können (nicht dargestellt).

#### 4.3.4.2 Antioxidantien, Zytokin, Surfactantprotein (SP-A, SP-D), Cholin kinase (CK $\alpha$ , CK $\beta$ ) und Cholinphosphatcytidyl-Transferase $\alpha$ (CTP $\alpha$ ) mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten

Pr90<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>-BSA</sup> reduzierte die SOD2 und SP-D Expression bei gleichzeitiger Erhöhung des IL-6R $\alpha$ , während Pr90<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup> die GPX4, KAT und CK $\alpha$  mRNA-Expression minderte. NA-Pr90<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup> reduzierte die GPX3, SP-A und CK $\alpha$  mRNA-Expression und steigerte gleichzeitig die IL-6R $\alpha$  Expression. Eine verminderte GR und IL-6R $\alpha$  mRNA-Expression wurde nach Applikation von BaP-Pr90<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup> beobachtet. PAK-AR<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup> reduzierte die GPX3, GPX4, SP-A, CK $\alpha$  und CTP $\alpha$  mRNA-Expression. PAK-AR<sub>15 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup> induzierte eine verminderte GPX4 Expression, während DQ12<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>-BSA</sup> die Expression der SOD2, KAT, SP-A, SP-D, CK $\alpha$ , CK $\beta$  und CTP $\alpha$  reduzierte. Gleichzeitig senkte die NaCl<sub>70 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> Negativkontrolle die SP-A, SP-D und CK $\alpha$  und H<sub>2</sub>O<sub>70 $\mu$ l</sub><sup>+BSA</sup> die CK $\alpha$  Expression (Tab. 19 und 20).

**Tab. 19: mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten, Teil I**

|  | SOD1      | SOD2              | SOD3      | GR                | GPX3              | GPX4              | KAT               |
|--|-----------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ | 1,0 ± 0,0 | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,2 | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,1         |
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,0         | 0,8 ± 0,3 | 0,8 ± 0,1         | 0,6 ± 0,1         | 0,7 ± 0,1         | 1,0 ± 0,3         |
| $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$        | 1,0 ± 0,1 | 0,8 ± 0,2         | 1,0 ± 0,4 | 0,7 ± 0,2         | 0,7 ± 0,1         | 1,0 ± 0,3         | 0,8 ± 0,2         |
| $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | 0,9 ± 0,1 | <b>0,6 ± 0,1*</b> | 0,8 ± 0,2 | 0,6 ± 0,1         | 0,9 ± 0,2         | 0,7 ± 0,2         | <b>0,4 ± 0,1*</b> |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | 0,9 ± 0,1 | <b>0,5 ± 0,1*</b> | 1,8 ± 0,5 | 1,2 ± 0,3         | 1,5 ± 0,2         | 1,4 ± 0,3         | 0,8 ± 0,2         |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$         | 1,3 ± 0,1 | 0,7 ± 0,1         | 1,1 ± 0,5 | 0,5 ± 0,1         | 1,2 ± 0,1         | <b>0,4 ± 0,1*</b> | <b>0,3 ± 0,1*</b> |
| $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | 1,0 ± 0,1 | 0,7 ± 0,1         | 0,6 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0         | <b>0,4 ± 0,1*</b> | 1,3 ± 0,2         | 1,3 ± 0,1         |
| $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$     | 0,9 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1         | 0,5 ± 0,1 | <b>0,4 ± 0,1*</b> | 1,0 ± 0,2         | 0,7 ± 0,1         | 0,9 ± 0,2         |
| $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$       | 1,0 ± 0,1 | 0,9 ± 0,2         | 0,5 ± 0,1 | 0,6 ± 0,2         | <b>0,6 ± 0,1*</b> | <b>0,5 ± 0,2*</b> | 0,8 ± 0,2         |
| $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | 0,7 ± 0,0 | 0,9 ± 0,1         | 0,3 ± 0,1 | 1,0 ± 0,5         | 1,5 ± 0,5         | <b>0,3 ± 0,1*</b> | 0,6 ± 0,2         |

Darstellung der Ergebnisse als x-fache mRNA-Expressionsänderung vs.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  ( $p < 0,05$ );  $n = 4-41$

**Tab. 20: mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten, Teil II**

|  | IL-6      | IL-6R $\alpha$    | SP-A              | SP-D              | CK $\alpha$       | CK $\beta$        | CTP $\alpha$      |
|--|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ | 1,0 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,0         | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,1         | 1,0 ± 0,2         |
| $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ | 1,0 ± 0,3 | 1,3 ± 0,2         | 0,8 ± 0,2         | 0,9 ± 0,1         | <b>0,5 ± 0,2*</b> | 0,6 ± 0,1         | 0,5 ± 0,1         |
| $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$        | 0,7 ± 0,2 | 1,5 ± 0,5         | <b>0,6 ± 0,3*</b> | <b>0,7 ± 0,1*</b> | <b>0,3 ± 0,1*</b> | 0,7 ± 0,2         | 0,7 ± 0,2         |
| $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | 1,3 ± 0,3 | 0,9 ± 0,2         | <b>0,2 ± 0,1*</b> | <b>0,6 ± 0,1*</b> | <b>0,3 ± 0,1*</b> | <b>0,3 ± 0,0*</b> | <b>0,2 ± 0,1*</b> |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$         | 1,2 ± 0,3 | <b>1,5 ± 0,2*</b> | 0,7 ± 0,1         | <b>0,8 ± 0,1*</b> | 0,9 ± 0,1         | 0,8 ± 0,1         | 1,1 ± 0,2         |
| $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$         | 1,7 ± 0,4 | 0,8 ± 0,1         | 0,9 ± 0,1         | 1,2 ± 0,2         | <b>0,5 ± 0,1*</b> | 0,6 ± 0,1         | 0,6 ± 0,1         |
| $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | 1,4 ± 0,2 | <b>3,4 ± 1,0*</b> | <b>0,1 ± 0,0*</b> | 1,0 ± 0,2         | <b>0,3 ± 0,1*</b> | 0,5 ± 0,2         | 0,4 ± 0,2         |
| $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$     | 0,7 ± 0,1 | <b>0,4 ± 0,1*</b> | 1,0 ± 0,2         | 1,3 ± 0,1         | 1,2 ± 0,3         | 1,0 ± 0,2         | 0,7 ± 0,1         |
| $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$       | 1,1 ± 0,2 | 1,1 ± 0,3         | <b>0,4 ± 0,1*</b> | 0,8 ± 0,1         | <b>0,3 ± 0,1*</b> | 0,6 ± 0,1         | <b>0,3 ± 0,1*</b> |
| $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$      | 1,6 ± 0,3 | 2,3 ± 0,6         | 1,2 ± 0,4         | 1,0 ± 0,2         | 1,1 ± 0,3         | 1,6 ± 0,4         | 1,8 ± 0,5         |

Darstellung der Ergebnisse als x-fache mRNA-Expressionsänderung vs.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  ( $p < 0,05$ );  $n = 3-34$

#### 4.4 Pilotstudie zur subchronischen Carbon Black Nanopartikel Exposition

Da in der Natur eine wiederholte Partikelinhalation wahrscheinlicher ist als eine Einfachexposition wurde eine Pilotstudie zur CBNP Langzeitexposition durchgeführt. Während des subchronischen Experimentes wurden folgende Versuchsgruppen miteinander verglichen: chemisch unveränderte Pr90<sup>-BSA</sup> CBNP, der DQ12<sup>-BSA</sup> Referenzpartikel und die H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Negativkontrolle.

Wie bei den einmaligen Probenaspirationen kam es auch nach den mehrfachen Applizierungen während des subchronischen Experimentes zu kurzzeitig erschwerten Atmungen durch Partikelapplizierung. Während des Experiments starben zwei Mäuse durch die Narkose kurz vor Verabreichung der letzten Pr90<sub>7μg</sub><sup>-BSA</sup> Suspensionen. Die mehrfache Aspiration von DQ12 führte zu einer marginalen Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere, was sich durch struppiges Fell äußerte. Die Bestimmung des Körpergewichtes (Daten nicht dargestellt) am Ende des Experimentes zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen.

#### 4.4.1 Einfluss der CBNP auf die Lungenfunktion

Die Mehrfachapplikation von  $\text{Pr90}^{-\text{BSA}}$  führte im Vergleich zur einmaligen  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Aspiration während des Kurzzeitexperimentes zu einer massiven Funktionseinschränkung der Lunge (Abb. 19 und 11). Die mehrfache Applikation des Referenzpartikels  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  führte hingegen zu keiner Verschlechterung, obwohl bereits die einfache Aspiration die Lungenfunktion im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  stark einschränkte.

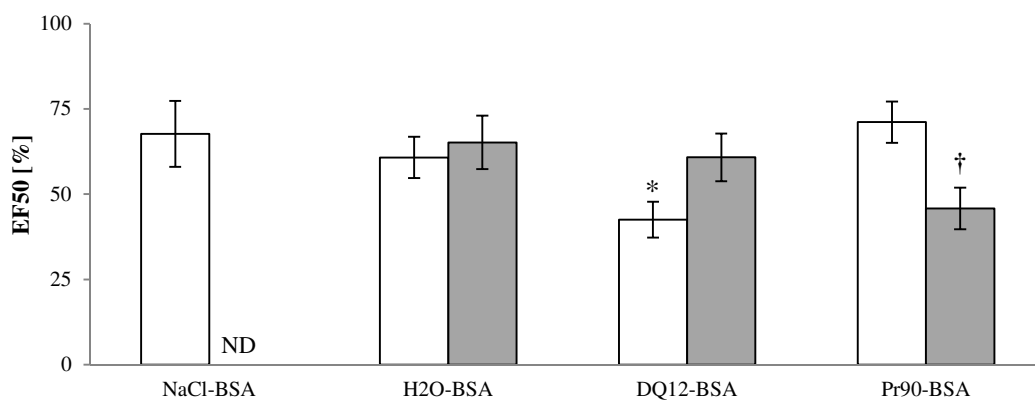


Abb. 19: Lungenfunktion ( $n = 5-19$ ) nach einmaliger Aspiration und 2-tägiger Retentionszeit (weiße Balken) und 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration (graue Balken). Expiratorischer Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen (EF50 [%]). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \* Signifikante Veränderung vs.  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  ( $p < 0,05$ ); † Signifikante Veränderung vs.  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  des Kurzzeitexperimentes ( $p < 0,05$ ); ND - nicht durchgeführt

#### 4.4.2 Histologie

##### 4.4.2.1 Veränderungen der Histologie des terminalen Respirationstraktes und Mukussekretion der Becherzellen

Durch die Hämatoxylin-Eosin Färbung konnte gezeigt werden, dass die mehrfache Aspiration von Pr90<sup>-BSA</sup> einen massiven Einstrom von Makrophagen in der Nähe des Bronchialepithels induzierte (Abb. 20). Die mehrfache DQ12<sup>-BSA</sup> Aspiration führte außerdem zu einer Verdickung und Deformierung der Alveolarsepten, während Pr90<sup>-BSA</sup> behandelte Tiere wie die H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Negativkontrolle (nicht dargestellt) keine morphologischen Veränderungen hervorriefen. Durch die PAS-Reaktion konnte weder bei CBNP behandelten Tieren, noch bei den Kontrollgruppen eine veränderte Mukussekretion beobachtet werden (Abb. 20).

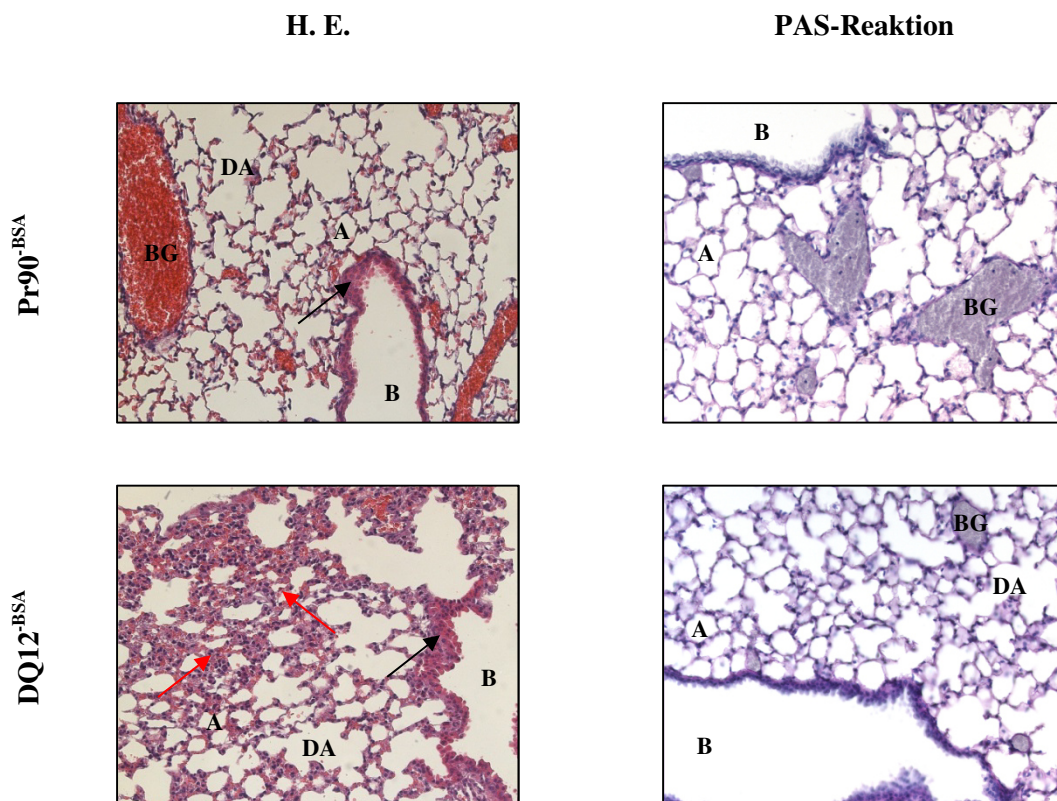


Abb. 20: Übersichtsaufnahmen H. E. und PAS-Reaktion gefärbter Lungenschnitte 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration. Versuchstiergruppen: H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup>, Pr90<sup>-BSA</sup> und DQ12<sup>-BSA</sup> (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Markierung der Makrophageninfiltration bzw. Verdickung der Alveolarsepten durch schwarze bzw. rote Pfeile; Vergrößerung: x200



#### 4.4.2.2 Kollagenexpression in der Lunge

Nach mehrfacher  $\text{Pr90}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  Aspiration zeigten sich deutliche Kollageneinlagerungen um die Bronchiolen und Blutgefäße (Abb. 21). Verdickte Alveolarsepten konnten nur nach mehrfacher  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  Applikation beobachtet werden. Die Lungenschnitte  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  behandelter Tiere zeigten keine morphologischen Veränderungen.

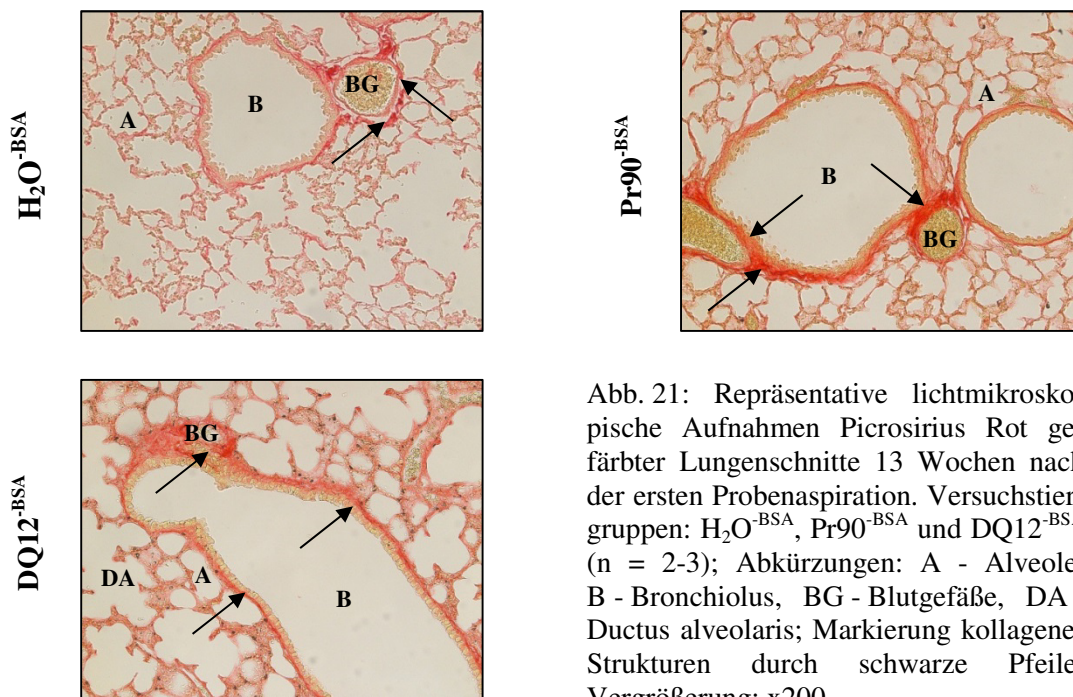


Abb. 21: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen Picrosirius Rot gefärbter Lungenschnitte 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  ( $n = 2-3$ ); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäße, DA - Ductus alveolaris; Markierung kollagener Strukturen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x200

#### 4.4.2.3 Immunhistochemie

##### 4.4.2.3.1 Proliferations- und Zelltod-Analyse

Die mit Proliferationsmarker gefärbten Lungenschnitte in Abb. 22 zeigen eine intensive Zellteilung im Epithel der Bronchien und in den Septen der Alveolen in allen Versuchstiergruppen. Im Vergleich zu den Einfachapplikationen während des Kurzzeitexperimentes (Abb. 15) konnte eine leicht verstärkte Zellproliferation beobachtet werden. Der Einsatz des Apoptosemarkers Caspase 3 (Abb. 22) zeigte keine markanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen nach subchronischer Exposition und im Vergleich zur einmaligen Applikation im Kurzzeitexperiment (Abb. 15).

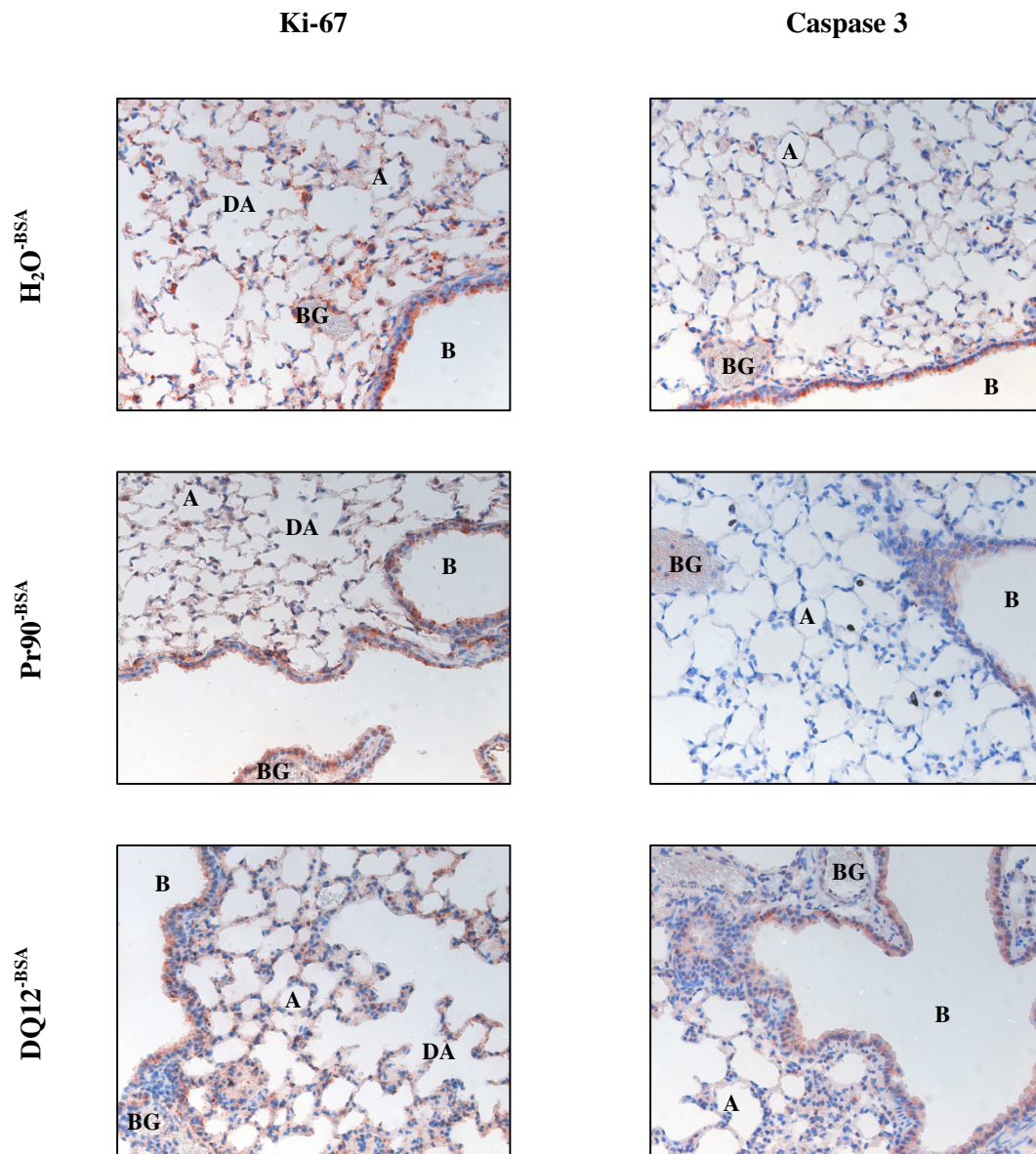


Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67 (links) und Caspase 3 (rechts) nach 13-wöchiger Verweildauer in der Lunge (braun-rot). Versuchstiergruppen:  $H_2O$ -BSA, Pr90-BSA und DQ12-BSA (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200



#### 4.4.2.3.2 Antioxidantien-Proteinexpression

Sowohl nach Partikelaspiration, als auch nach Applikation der Negativkontrolle konnte eine intensive Produktion der antioxidativ wirksamen Enzyme SOD2 und GPX3 innerhalb des Bronchialepithels und in den Zellen der Alveolarsepten beobachtet werden (Abb. 23). Im Vergleich zum Kurzzeitexperiment induzierten die Mehrfachapplikationen eine leicht verstärkte SOD2- bzw. GPX3-Expression (Abb. 16).

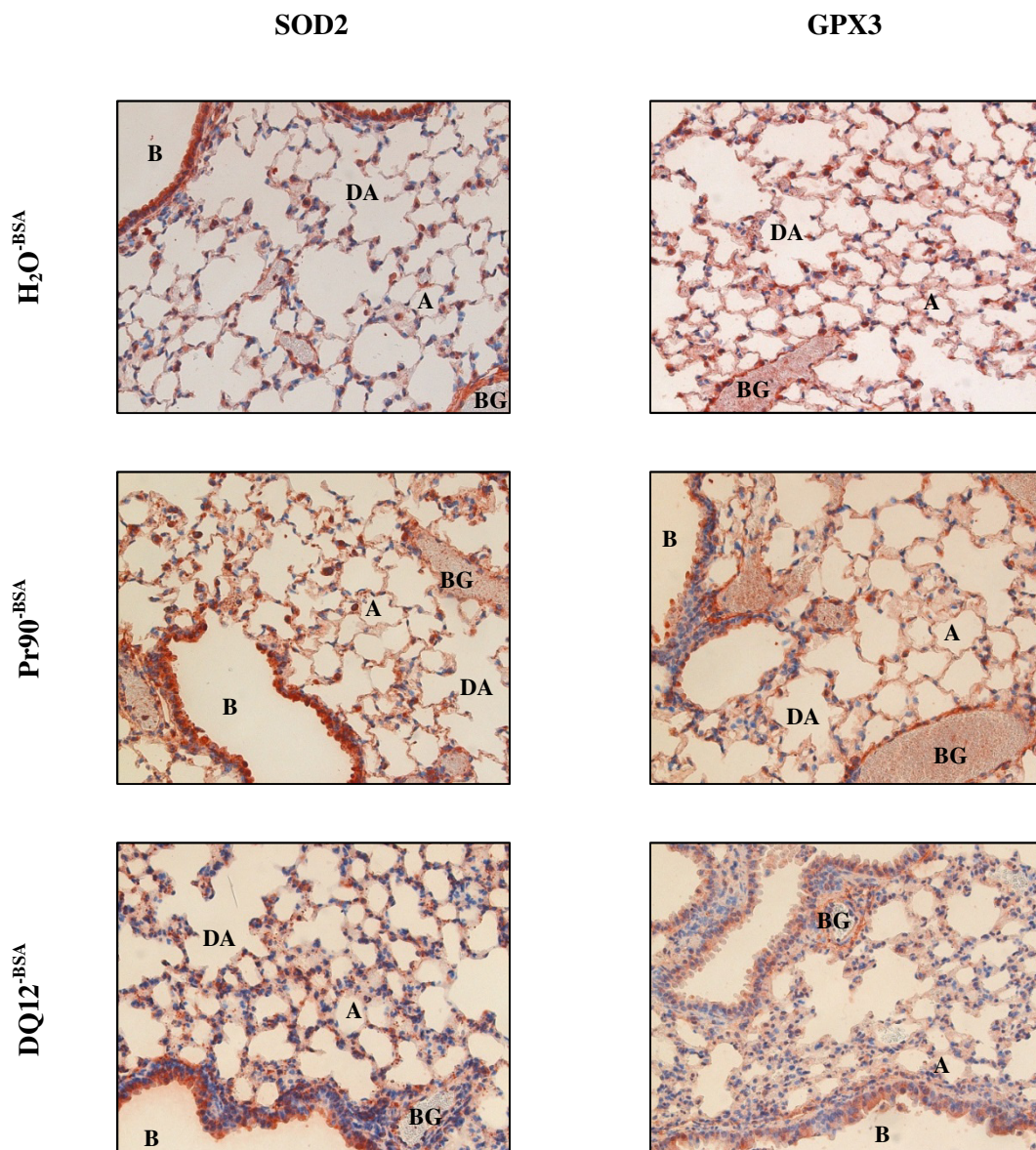


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis der SOD2 (links) und GPX3 (rechts) nach 13-wöchiger Verweildauer in der Lunge (braun-rot). Versuchstiergruppen:  $H_2O$ -BSA, Pr90-BSA und DQ12-BSA (n = 2-3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200

#### 4.4.3 IgE-Konzentration im Plasma

Die Bestimmung der Plasma IgE-Konzentration zeigte auch während der subchronischen Exposition ( $n = 4-6$ ) keine Unterschiede zwischen Pr90<sup>-BSA</sup> behandelten Tieren ( $162,7 \pm 33,6$  ng/ml), dem Referenzpartikel DQ12<sup>-BSA</sup> ( $134,7 \pm 38,1$  ng/ml) und der H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Kontrolle ( $172,4 \pm 46,1$  ng/ml).

#### 4.4.4 Einfluss von CBNP auf die Bronchoalveoläre Lavage

Der Vergleich der Zytospinpräparate in Abb. 25 zeigt keine massiven Veränderungen der Zellzusammensetzung nach CBNP- bzw. Referenzpartikelexposition. Dieses Ergebnis wurde durch die Zellzählung (Tab. 21) bestätigt. Die mehrmalige Partikelaspiration führte jedoch zu einer verstärkten Vakuolenbildung im Zytoplasma partikelgefüllter Makrophagen. Der Vergleich zwischen Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup> Einfachapplikation und Pr90<sup>-BSA</sup> Mehrfachapplikation im subchronischen Experiment zeigte eine Abnahme eosinophiler Granulozyten und einen Anstieg an Makrophagen (Tab. 21 und 16).

**Tab. 21: Zelldifferenzierung der BAL**

|                                      | Gesamt-<br>zellzahl | Makro-<br>phagen              | Neutro-<br>phile | Lympho-<br>zyten | Eosino-<br>phile             |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup></b> | 46,5 ± 3,6          | 46,4 ± 3,5                    | 0,2 ± 0,1        | 0,2 ± 0,1        | 0,0 ± 0,0                    |
| <b>Pr90<sup>-BSA</sup></b>           | 51,6 ± 5,3          | <b>50,5 ± 5,0<sup>†</sup></b> | 0,9 ± 0,3        | 0,3 ± 0,1        | <b>0,0 ± 0,0<sup>†</sup></b> |
| <b>DQ12<sup>-BSA</sup></b>           | 61,1 ± 4,2          | 59,3 ± 4,2                    | 0,4 ± 0,2        | 0,5 ± 0,2        | 0,8 ± 0,6                    |

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Zelldifferenzierung der BAL-Zytospinpräparate erfolgte unter dem Mikroskop durch auszählen 5 repräsentativer Gesichtsfelder (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> ( $p < 0,05$ ); <sup>†</sup>Signifikante Veränderung vs. gleicher Exposition im Kurzzeitexperiment ( $p < 0,05$ );  $n = 8-9$

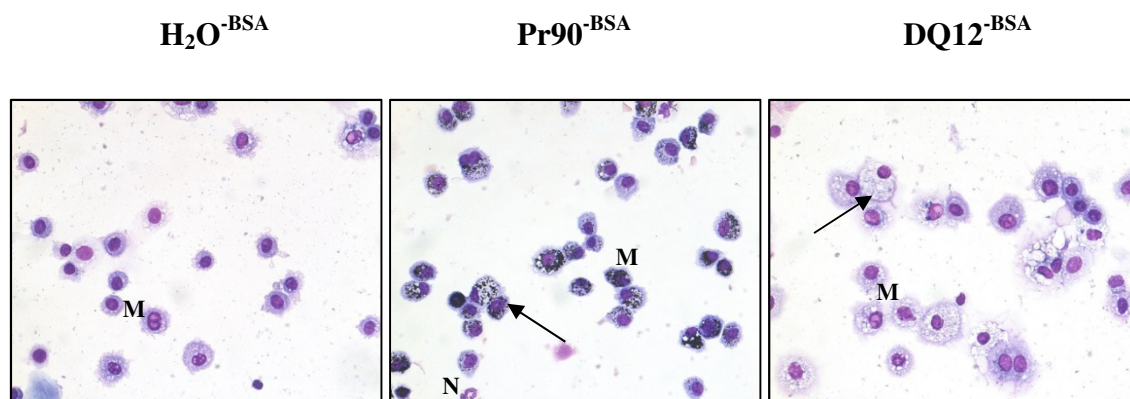


Abb. 25: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der BAL-Zytospinpräparate 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration. Versuchstiergruppen:  $\text{H}_2\text{O}^{\text{-BSA}}$ ,  $\text{Pr90}^{\text{-BSA}}$  und  $\text{DQ12}^{\text{-BSA}}$  ( $n = 8-9$ ); Abkürzungen: M - Makrophage, N - Neutrophiler Granulozyt; May-Grünwald-Giemsa-Färbung; Markierung Partikel gefüllter Makrophagen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung:  $\times 400$

Der BAL-Phospholipidgehalt stieg durch die mehrfache Aspiration von  $\text{Pr90}^{\text{-BSA}}$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}^{\text{-BSA}}$  Kontrolle an, während sich der Gesamtproteinanteil im Vergleich zur Einfachapplikation verringerte. Die LDH-Konzentrationen blieben wie im Kurzzeitexperiment unverändert (Tab. 22 und 17).

**Tab. 22: Parameter der BAL**

|                                    | Protein<br>[ $\mu\text{g/ml}$ ] | Phospholipid<br>[ $\mu\text{g/ml}$ ] | LDH<br>[U/L]  |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| $\text{H}_2\text{O}^{\text{-BSA}}$ | $145,6 \pm 6,0$                 | $78,3 \pm 7,2$                       | $3,3 \pm 0,9$ |
| $\text{Pr90}^{\text{-BSA}}$        | $155,9 \pm 11,0^\dagger$        | $104,7 \pm 7,1^*$                    | $4,4 \pm 1,1$ |
| $\text{DQ12}^{\text{-BSA}}$        | $196,4 \pm 22,1$                | $84,9 \pm 5,5$                       | $3,6 \pm 0,8$ |

Mittelwerte  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test:  $^*$ Signifikante Veränderung vs.  $\text{H}_2\text{O}^{\text{-BSA}}$  ( $p < 0,05$ );

$^\dagger$ Signifikante Veränderung vs. gleicher Exposition im Kurzzeitexperiment ( $p < 0,05$ );  $n = 8-9$

#### 4.4.5 Zellzahl und Gesamtproteingehalt isolierter Typ II Pneumozyten

Die Anzahl isolierter Typ II Pneumozyten blieb nach mehrfacher Pr90<sup>-BSA</sup> bzw. DQ12<sup>-BSA</sup> Exposition im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Kontrolle unverändert, während die H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Kontrolle und der Referenzpartikel DQ12<sup>-BSA</sup> erhöhte Proteinkonzentrationen gegenüber der Einfachapplikation im Kurzzeitexperiment induzierten (Tab. 23 und 18).

**Tab. 23: Zellausbeute und Gesamtproteingehalt**

|                                  | Isolierte<br>Typ II Pneumozyten       | Proteinkonzentration pro<br>1 Million Zellen<br>[µg/ml] |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| H <sub>2</sub> O <sup>-BSA</sup> | $7,5 \times 10^6 \pm 8,8 \times 10^5$ | <b>713,6 ± 124,3<sup>†</sup></b>                        |
| Pr90 <sup>-BSA</sup>             | $7,8 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^5$ | 635,2 ± 82,0  |
| DQ12 <sup>-BSA</sup>             | $7,0 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$ | <b>755,8 ± 101,3<sup>†</sup></b>                        |

Mittelwerte ± SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \*Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> (p < 0,05);

<sup>†</sup>Signifikante Veränderung vs. gleicher Exposition im Kurzzeitexperiment (p < 0,05); n = 8-9

##### 4.4.5.1 Antioxidantien, Zytokin, Surfactantprotein (SP-A, SP-D), Cholinase (CKα, CKβ) und Cholinphosphatcytidyl-Transferase α (CTPα) mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten

Die Analyse der Typ II Pneumozyten mRNA-Expression antioxidativ wirksamer Enzyme ergab nach mehrfacher Partikelapplikation keine Veränderungen. Im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Kontrolle kam es jedoch durch die Applikation von Pr90<sup>-BSA</sup> zu einer verminderten SP-D und CKβ mRNA-Expression während im Vergleich zur einmaligen Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup> Applikation im Kurzzeitexperiment die mRNA-Expression von IL-6Rα, CKα und CTPα stark abnahm. Die mehrfache Referenzpartikelapplikation führte zu einer reduzierten CKβ mRNA-Expression im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> Kontrolle und zur verminderten mRNA-Expression von IL-6 im Vergleich zur einmaligen DQ12<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration. Die Expression von SP-A, SP-D, CKβ und CTPα wurden gleichzeitig erhöht (Tab. 24, 19 und 20).

**Tab. 24: mRNA-Expression in Typ II Pneumozyten**

|                                       | <b>SOD1</b> | <b>SOD2</b> | <b>SOD3</b> | <b>GR</b> | <b>GPX3</b> | <b>GPX4</b> | <b>KAT</b> |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b> <sup>-BSA</sup> | 1,0 ± 0,1   | 1,0 ± 0,2   | 1,0 ± 0,3   | 1,0 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1   | 1,0 ± 0,3   | 1,0 ± 0,2  |
| <b>Pr90</b> <sup>-BSA</sup>           | 0,8 ± 0,1   | 0,9 ± 0,1   | 0,7 ± 0,3   | 0,9 ± 0,3 | 1,0 ± 0,2   | 0,6 ± 0,1   | 0,5 ± 0,2  |
| <b>DQ12</b> <sup>-BSA</sup>           | 0,8 ± 0,1   | 0,7 ± 0,1   | 0,5 ± 0,1   | 0,5 ± 0,0 | 0,8 ± 0,2   | 1,3 ± 0,5   | 0,8 ± 0,3  |

|                                       | <b>IL-6</b>                  | <b>IL-6R<math>\alpha</math></b> | <b>SP-A</b>                  | <b>SP-D</b>                  | <b>CK<math>\alpha</math></b> | <b>CK<math>\beta</math></b>   | <b>CTP<math>\alpha</math></b> |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b> <sup>-BSA</sup> | 1,0 ± 0,2                    | 1,0 ± 0,2                       | 1,0 ± 0,2                    | 1,0 ± 0,1                    | 1,0 ± 0,2                    | 1,0 ± 0,1                     | 1,0 ± 0,2                     |
| <b>Pr90</b> <sup>-BSA</sup>           | 0,4 ± 0,1                    | <b>0,5 ± 0,2<sup>†</sup></b>    | 0,4 ± 0,1                    | <b>0,6 ± 0,1<sup>*</sup></b> | <b>0,6 ± 0,2<sup>†</sup></b> | <b>0,5 ± 0,1<sup>*</sup></b>  | <b>0,4 ± 0,2<sup>†</sup></b>  |
| <b>DQ12</b> <sup>-BSA</sup>           | <b>0,5 ± 0,1<sup>†</sup></b> | 0,7 ± 0,3                       | <b>0,8 ± 0,2<sup>†</sup></b> | <b>1,1 ± 0,1<sup>†</sup></b> | 0,6 ± 0,1                    | <b>0,6 ± 0,1<sup>*†</sup></b> | <b>0,7 ± 0,2<sup>†</sup></b>  |

Darstellung der Ergebnisse als x-fache mRNA-Expressionsänderung vs. H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: \* Signifikante Veränderung vs. H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> (p < 0,05); <sup>†</sup>Signifikante Veränderung vs. gleicher Exposition im Kurzzeitexperiment (p < 0,05); n = 4-8

## 5. Diskussion

Hohe Luftverschmutzungen können zu Herzerkrankungen, Schlaganfällen und Lungenerkrankungen wie COPD und Lungenkrebs führen. Allein im Jahr 2012 starben rund 7 Millionen Menschen auf Grund verunreinigter Luft (WHO, 2014, Abschn. 1). Ob und in welchem Ausmaß luftgetragene Partikel, insbesondere kohlenstoffbasierte Nanopartikel (CBNP), mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm die Funktion der Lunge einschränken bzw. bestehende Lungenerkrankungen weiter fördern ist ungeklärt. Anders als bei gröberen Luftbestandteilen wie z. B. Ruß oder Staub ist die Bestimmung des NP-Anteils in der Atmosphäre nur mit hohem technischem und zeitlichem Aufwand möglich und erfordert außerdem detaillierte Fachkenntnisse und Erfahrungen in den Bereichen Nanotechnologie und Umweltanalytik (Fiedeler & Fries, 2011). Eine flächendeckende, standardisierte Erfassung einzelner NP ist daher derzeit noch nicht möglich.

Trotz einer ca. 20-jährigen Nutzung von CBNP und intensiven Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der NP-Synthese gibt es bis heute keine etablierten Prüfverfahren bezüglich ihrer Wirksamkeit auf den Menschen. Die veränderten chemischen und physikalischen Partikeleigenschaften schränken die Nutzung herkömmlicher Tests sehr häufig ein bzw. verhindern deren Einsatz ganz. Hauptursache sind dabei Interaktionen der NP mit Probenbestandteilen und/oder Nachweissubstanzen bzw. die Absorption des verwendeten Lichtstrahles (Stone et al., 2009; Dhawan & Sharma, 2010).

Zur toxikologischen Beurteilung kohlenstoffbasierter NP wurde 2008 das Verbundprojekt „Carbon Black“ gegründet, um die Wirkung diverser oberflächenfunktionalisierter CBNP auf die einzelnen Abschnitte des Respirationstraktes empirisch zu untersuchen. Eine Übersicht der beteiligten Arbeitsgruppen sowie deren Untersuchungsschwerpunkte befindet sich in Tab. 25 (Fehrenbach, 2010).



**Tab. 25: Übersicht der „Carbon Black“ Verbundpartner**

| <b>Verbundpartner</b>  | <b>Untersuchungsschwerpunkte</b>  |
|--|---|
| Universität Karlsruhe<br>Institut für Technische Chemie und Polymerchemie<br>Prof. Dr. H. Bockhorn, Ing.   | Synthese (Gasphasensynthese) und detaillierte Charakterisierung oberflächenfunktionalisierter CBNP  |
| Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin<br>Abteilung In-vitro-Toxikologie<br>Dr. T. Hansen                                | Bestimmung der toxischen Schwellendosis anhand humaner Zelllinien (A549, Calu-3 etc.), Precision-cut lung slices; Inhalationsversuch mit ausgewählten CBNP-Funktionalisierungen     |
| Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften<br>Bereich Experimentelle Pneumologie<br>Prof. Dr. H. Fehrenbach    | Isolierung und Untersuchung der Bronchien und Bronchiolen (Histologie, molekularbiologische Untersuchungen etc.)  |
| Universität zu Lübeck<br>Institut für Anatomie<br>Prof. Dr. P. König   | Isolierung und Untersuchung der Trachea (Hochgeschwindigkeitsmikroskopie, Histologie, molekularbiologische Untersuchungen etc.)   |
| <b>Philipps-Universität Marburg</b><br><b>Abteilung für Pneumologie</b><br><b>Labor für Zellbiologie der Lunge</b><br><b>Prof. Dr. B. Müller</b> | <b>Untersuchung des terminalen Lungenabschnittes (Oropharyngeale Aspiration von CBNP, Lungenfunktionsprüfung, Isolation von Typ II Pneumozyten, Histologie, BAL-Gewinnung etc.)</b> |

## 5.1 Optimierung der Partikelretentionszeit

Die toxikologische *in vivo* Analyse kohlenstoffbasierter NP erfordert eine umfangreiche Prüfung bestehender Testprotokolle auf Anwendbarkeit. Grund für den eingeschränkten Methodentransfer sind abweichende chemische und physikalische Eigenschaften der CBNP gegenüber nicht-nanoskaligen Materialien gleicher Zusammensetzung und damit verbundene, mögliche Störungen durch Partikel-Protein-Interaktionen bzw. Proteininaktivierung in Abhängigkeit von der Materialzusammensetzung, der Inkubationszeit und der verwendeten Dosis (Jacobsen et al., 2008; Holder et al., 2012; Kroll et al. 2012).

Die Vielzahl bestehender Partikelapplizierungsmethoden, sowie unterschiedliche Einsatzmengen, abweichende chemische Zusammensetzungen und variierende Oberflächengrößen bzw. Funktionalisierungen der zu testenden CBNP erschweren den Vergleich von Ergebnisse mit Resultaten anderer Studien zusätzlich (Jacobsen et al., 2008; Krug, 2014).

Der negative Effekt verschiedener Partikeldosen und Expositionszeiträume auf die Lungen wurde bereits durch verschiedene *in vivo* Toxizitätsstudien bestätigt (Renwick et al., 2004; Stoeger et al., 2006). Insbesondere Versuche mit geringen Konzentrationen untermauern die von CBNP ausgehende Gefahr. Studien mit sehr hohen, realitätsfernen CBNP-Dosen treten hingegen immer mehr in den Hintergrund (Renwick et al., 2004; Shimada et al., 2006; Kamata et al., 2011; Kyjovska et al., 2014). In Anlehnung an die Arbeiten mit geringen Applizierungsdosen wurde für die Vorversuche eine Konzentration von 5 µg CBNP pro Maus festgelegt. Da die Größe der Partikeloberfläche ein entscheidender Faktor hinsichtlich des toxischen Potentials des zu testenden Materials ist, wurde außerdem die Referenzpartikeloberfläche durch Anhebung der Konzentration von 5 auf 172 µg DQ12 gegenüber 5 µg Printex®90 auf Grund variierender Partikelformen annähernd adjustiert.

Die Applizierung der zu testenden Partikel erfolgte per oropharyngealer Aspiration. Ein Verfahren, welches durch einfache, präzise Verabreichung kleiner Suspensionsmengen und damit verbundenen Einsparungen an Testsubstanz hervorsticht. Die zu allen Zeitpunkten beobachteten Schwarzfärbungen der Lungen nach Pr90<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup> Behandlung sprechen außerdem für eine sehr gute, realitätsnahe Verteilung der CBNP in den Lungen durch das gewählte Applizierungsverfahren (Rao et al., 2003; Lakatos et al., 2006; De Vooght et al., 2009).

Die strukturelle und funktionelle Integrität der Lunge wurde durch CBNP Aspiration nicht beeinflusst. Dies zeigte sich durch unveränderte Mukussekretion der Becherzellen und fehlende Kollageneinlagerungen. Makroskopisch sichtbare Schädigungen der Lungen nach DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration deuteten auf massiv veränderte alveoläre Strukturen. Bei genauerer mikroskopischer Betrachtung wurde dies aber nicht bestätigt. Die Lunge ist auf Grund des hohen lokalen Sauerstoffpartialdruckes, der großen Oberfläche und durch die mögliche Inhalation von Luftschadstoffen stets einer gesteigerten Anfälligkeit für oxidativen Stress durch Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. Durch die kontinuierliche Produktion antioxidativer Enzyme wird diese Gefahr stets auf ein Minimum reduziert. Zu diesen Enzymen gehören u. a. die Glutathionreduktase (GR), verschiedene Glutathionperoxidasen (GPX 3 und 4), Superoxiddismutasen (SOD 1, 2 und 3) und die Katalase (KAT) (Kinnula & Crapo, 2003). Beim Vergleich der Versuchsgruppen konnte eine gleichbleibende Proteinexpression aller getesteten Antioxidantien im Epithel des terminalen Respirationstraktes verzeichnet werden. Beispielsweise wurde die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (SOD1) kontinuierlich in Bronchialepithelzellen und Zellen der Alveolarsepten nachgewiesen. Das Enzym befindet sich vorrangig im Zytoplasma der Zellen und katalysiert dort den Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (Quinlan et al., 1994).

Alveolarmakrophagen stellen den Hauptclearancemechanismus in der Alveolarregion (Sibille & Reynolds, 1990). Die BAL-Zytospinpräparate CBNP und DQ12 behandelte Tiere zeigen eine deutliche Aufnahme von Partikeln durch Makrophagen. DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> induzierte Veränderungen der zellulären Zusammensetzung der BAL, die Erhöhung des Proteinanteils in der BAL und veränderte mRNA-Expressionen in Typ II Pneumozyten sprechen für eine aktive alveoläre Partikelclearance, akute Zellschädigung und Veränderungen innerhalb des Zellmetabolismus (Sibille & Reynolds, 1990; Fehrenbach, 2001; Tötsch et al., 2007).

Typ II Pneumozyten sind Bestandteil des Alveolarbereiches und tragen entscheidend zur Aufrechterhaltung der Lungenfunktion bei. Sie produzieren Surfactant, eine für die Stabilität der Alveolen und Bronchiolen wichtige Substanz (Von Neergaard, 1929; Macklin, 1954; Nicholas, 1996).

Nur durch eine ungestörte Surfactantsynthese kann der Gasaustausch und eine ausreichende Immun- und Infektabwehr des terminalen Respirationstraktes gewährleistet werden (Fehrenbach, 2001). Da die Zellen zusätzlich als Progenitorzellen für Typ I Alveolarepithelzellen dienen, spricht eine erhöhte Typ II Pneumozyten-Ausbeute nach DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration an Tag 7 für eine gesteigerte Apoptose von Typ I Zellen (Adamson & Bowden, 1975). Die erhöhten Gesamtproteinkonzentrationen an Tag 1 und 3 sprechen außerdem für eine Störung des Typ II Pneumozyten-Metabolismus. Die geringen Konzentrationen von Pr90<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup> bzw. DQ12<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup> waren höchstwahrscheinlich zu niedrig, um nachhaltigen Einfluss auf die Proliferation der Typ II Pneumozyten bzw. die Proteinexpression auszuüben. Des Weiteren deuten erhöhte SOD3 mRNA-Expressionen nach Pr90<sub>5µg</sub><sup>-BSA</sup> bzw. verminderte KAT und SOD3 mRNA-Expressionen nach DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration auf verstärkten bzw. vorangegangenen oxidativen Stress in Typ II Pneumozyten hin (Diabaté et al., 2011). Die kurzzeitig erhöhte mRNA-Expression des Entzündungsmediators IL-6 und der Anstieg Neutrophiler Granulozyten in der BAL nach DQ12<sub>172µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration sind Hinweise auf einen akuten Entzündungsprozess in der Lunge (Sibille & Reynolds, 1990). Anders als größere, inhalierte Luftbestandteile können NP die Zellmembran durch nicht-phagozytöse Mechanismen überwinden (Geiser et al., 2005). Während der Protein- und RNA-Aufreinigung wurden CBNP-Agglomerate in der Proteinfraction vorgefunden, was ebenfalls auf eine Überwindung der Zellmembran bei Typ II Pneumozyten *in vivo* hindeutet.

Ein weiterer bestimmender Toxizitätsfaktor ist die Translokation der Partikel über das Blut- bzw. Lymphsystem und die Akkumulation in Sekundärorganen (Choi et al., 2010). Während des Vorversuches wurde die systemische Wirkung über die Veränderung der Plasma IgE Konzentration geprüft, wobei während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Konzentrationsveränderungen beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die applizierte CBNP Konzentration zu gering gewesen ist um systemische Effekte zu induzieren. Ein Abtransport über das Blut- und Lymphsystem und eine Anreicherung in anderen Organen kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden.

Bildgebende Analyseverfahren, wie die mikroskopischen Begutachtungen der Lungen zeigten sich als nur geringfügig störanfällig, da Interaktionen zwischen CBNP und den Färbemitteln bzw. Nachweisreagenzien nur eine untergeordnete Rolle spielten. Somit dienten sie als wichtige Grundlage für die Interpretation der biochemisch und molekularbiologisch ermittelten Resultate. Akute, CBNP-bedingte Effekte konnten bereits nach 3-tägiger Partikelretentionszeit erfasst werden. Gegenüber der 24-stündigen Partikelretentionszeit bot sich der Vorteil, dass eine Lungenfunktionsprüfung als weiterer aussagekräftiger Parameter in das Prüfverfahren aufgenommen werden konnte. Die Anpassung der DQ12-Oberfläche gegenüber  $\text{Pr90}_{5\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  führte zu einer intensiveren Störung der Lungenhomöostase durch den Referenzpartikel. Eine mögliche Ursache könnte der effektive Abtransport von CBNP über Blut und Lymphe sein (Choi et al., 2010). Für die Experimente mit oberflächenfunktionalisierten CBNP wurde die Partikeldosis für die NP und den Referenzpartikel in Abstimmung mit den anderen Arbeitsgruppen des Verbundprojektes zur besseren Vergleichbarkeit aller Ergebnisse von 5 auf 7  $\mu\text{g}$  pro Maus angehoben.

## 5.2 Toxizitätsvergleich oberflächenfunktionalisierter Carbon Black Nanopartikel nach akuter Exposition

Im Vergleich zu Produkten anderer Industriezweige sind Nanomaterialien hinsichtlich ihrer Gefahreneinstufung ein relativ neues Forschungsgebiet. Immer bessere Analyseverfahren, der damit verbundene Nachweis von NP verschiedenster Art in der Umwelt und das daraus gewachsene Bewusstsein einer möglichen Gefährdung für Mensch und Natur fordern jedoch eine detailliertere toxikologische Begutachtung (Jacobsen et al., 2008). Als einer der entscheidendsten Risikofaktoren gilt der geringe Partikeldurchmesser, welcher insbesondere Clearance- und Abwehrmechanismen der Lunge außer Kraft setzen kann und gleichzeitig die Translokation innerhalb des Körpers erleichtert (Oberdörster, 2001; Choi et al., 2010). Hinzu kommt eine je nach Art der NP mehr oder weniger reaktionsfreudige Oberfläche die zusätzliche Effekte auf biologische Strukturen ausüben kann. Bisherige Studien über kohlenstoffbasierte NP beschäftigten sich vorrangig mit der Prüfung verschiedener Expositionsdosen, Partikelretentionszeiten und dem Toxizitätsvergleich verschiedener Partikelformen wie z. B. single- (SWCNT) und multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) (Renwick et al., 2004; Nassimi et al., 2010; Nygaard et al., 2009).

Funktionalisierte CNT-Oberflächen wurden vor allem hinsichtlich ihrer Biokompatibilität für therapeutische Zwecke getestet (Sayes et al., 2006; Dumortier et al., 2006). Liu und Mitarbeiter (2013) verglichen beispielsweise die Wirkung von carboxylierten und unveränderten MWCNTs auf die humane Leberzelllinie L02. Die Ergebnisse der Studie zeigten geringere toxische Effekte der funktionalisierten Nanotubes gegenüber unveränderten Partikeln.

Saber und Kollegen (2012) untersuchten das inflammatorische und genotoxische Potential von Printex<sup>®</sup>90 und oberflächenbeschichteten bzw. unveränderten TiO<sub>2</sub>-Partikeln 24 h nach intratrachealer Instillation. Die verwendete Dosis betrug 54 µg pro Maus. Das als Referenzpartikel eingesetzte Printex<sup>®</sup>90 und unverändertes TiO<sub>2</sub> riefen die stärkste inflammatorische Reaktion hervor. Gleichzeitig wurden jedoch DNA-Schädigungen durch funktionalisierte TiO<sub>2</sub>-Partikel beobachtet, während unverändertes TiO<sub>2</sub> keine derartigen Effekte zeigte. Ruenraroengsak und Mitarbeiter (2012) testeten verschiedene oberflächenfunktionalisierte und unveränderte Polystyrol-Latex-NP (50 und 100 nm) an humanen, transformierten Typ I Zellen.

Beobachtet wurden schwere Verletzungen der Zellmembran durch die Funktionalisierung mit Amin, während unveränderte und carboxyl-funktionalisierte NP keine derartigen Schädigungen induzierten. Die Studien zeigen, dass die chemische Oberflächenfunktionalisierung von NP ein entscheidender Toxizität bestimmender Faktor ist. Auf Grund der unterschiedlichen Testmaterialien, geometrischen Strukturen, Applizierungsmethoden, Partikelkonzentrationen und Testsystemen ist ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studie jedoch nicht möglich.

CBNP werden bereits während des industriellen Herstellungsprozesses auf verschiedenste Weise chemisch funktionalisiert. Dieser Vorgang dient der Verbesserung der Materialeigenschaften und der Erschließung neuer Anwendungsgebiete (Soares et al., 2014). Neben der gezielten Veränderung der Oberfläche besteht außerdem die Möglichkeit einer unerwünschten Interaktion von CBNP mit Schadstoffen der Luft. Die Freisetzung von NP durch den Abrieb von Autoreifen wurde bereits 2006 nachgewiesen (Dahl et al., 2006). Die in der Luft stattfindende unkontrollierte Bindung von Schadstoffen an die CBNP-Oberfläche konnte auf Grund der fehlenden Analysemethoden noch nicht durch umweltanalytische Studien belegt werden. Dennoch handelt es sich um einen sehr wahrscheinlichen Vorgang, da es sich um sehr reaktionsfreudige Oberflächen handelt, welche leicht weitere chemische Reaktionen eingehen können (Brown et al., 2010).

Gemäß dem Hauptziel des Verbundprojektes, den Effekt definierter CBNP-Oberflächenfunktionalisierungen auf alle Abschnitte des Respirationstraktes anhand geringer Dosen durch eine Kombination aus *in vivo-in vitro*-Kurzzeitversuchen zu analysieren, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Bestimmung des Gefährdungspotentials im terminalen Abschnitt des Respirationstrakts. Um die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen vergleichen zu können, wurden die Partikelsuspensionen zentral am Fraunhofer Institut Hannover hergestellt und vor und nach CBNP Aspiration auf ihre Stabilität geprüft. Während der Herstellung der Suspensionen war es außer bei den nicht funktionalisierten CBNP nötig, BSA als stabilisierendes Agens hinzuzufügen. Da dies die Funktionalisierung der Partikeloberfläche überdecken bzw. dauerhaft verändern kann wurde die  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Kontrolle um eine  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ , sowie eine physiologischere  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle ergänzt (Dutta et al., 2007).

Zu den *in vivo* getesteten CBNP gehörten 9-Nitroanthracen (NA-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup>) bzw. Benzo[a]pyren funktionalisiertes Printex<sup>®</sup>90 (BaP-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup>) und Acetylenruß mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAK-AR<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup>). Auf Grund der unterschiedlichen Partikeldurchmesser und somit unterschiedlichen Oberflächenverhältnissen von Printex<sup>®</sup>90 und PAK-AR, wurde die Konzentration der Acetylenrußpartikel von 7 auf 15 µg angehoben und zur näheren Analyse der Oberflächenwirkung einbezogen (PAK-AR<sub>15µg</sub><sup>+BSA</sup>).

Die Auswahl der chemischen Funktionalisierungen wurde durch das Karlsruher Institut für Technologie auf Grund ihrer Umweltrelevanz vorgenommen. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAKs) sind ubiquitär in der Außenluft und entstehen u. a. bei Produktionsprozessen in der Reifen- bzw. Aluminiumindustrie und bei der Verbrennung organischer Substanzen. Die dadurch stark variierende chemische Zusammensetzung der gebildeten Aromaten bedeutet zugleich unterschiedliche toxische Potentiale (Lee & Vu, 2010). Über den polyzyklischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren (BaP) ist bekannt, dass es durch unvollständige Verbrennung organischer Substanzen entsteht und karzinogene Wirkung besitzt (IARC/WHO, 2012). 9-Nitroanthracen (NA) entsteht ebenfalls durch Verbrennung und ist z. B. in Dieselabgasen zu finden. Bisher fehlende Studien verhindern jedoch eine genaue Klassifizierung ihres toxischen Potentials (IARC/WHO, 1984).

Untersuchungsschwerpunkt im Bereich der Umweltanalytik ist die PAK-Anreicherung in urbanen Gebieten. Bisherige Studien bestätigten NA-Konzentrationen in der Luft und eine saisonale Variabilität der PAK-Konzentration in den Städten. Außerdem zeigten sich intensive Bindungen zwischen BaP und partikulärem Material ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) bei Verbrennungsprozessen (Rogula-Kozłowska et al., 2012; Zaciera et al., 2012; Kaur et al., 2013). Kohlenstoffbasierte NP könnten somit ebenfalls BaP und andere Schadstoffe binden. Die enorm vergrößerte, reaktive Oberfläche der CBNP lassen sogar vermuten, dass dieser Prozess wesentlich verstärkt wird und gleichzeitig das toxische Potential der Partikel erhöht.

Epidemiologische Studien beschäftigten sich vorrangig mit den gesundheitlichen Auswirkungen auf Mitarbeiter der CBNP produzierenden Fabriken, da diese einem höheren Lungenkrebsrisiko zu unterliegen scheinen. Die Interpretation der derzeit vorliegenden Daten ist jedoch schwierig.



Methodische Limitierungen und die Nichteinbeziehung weiterer gesundheitsgefährdender Parameter wie z. B. das Rauchverhalten der Arbeiter und unvollständige Datensätze der Kohorten schließen eine gesicherte Einstufung des Gefährdungspotentials aus (Hodgson & Jones, 1985; Wellmann et al., 2006).

Zur Interpretation der Ergebnisse oberflächenfunktionalisierter CBNP war es außerdem notwendig die Wirkung des Suspensionsmittels BSA näher zu untersuchen. Printex®90 konnte sowohl mit als auch ohne BSA ( $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ) stabil suspendiert werden. Dies ermöglichte den direkten Vergleich beider Suspensionen. Studien anderer Arbeitsgruppen belegen die Wichtigkeit der Suspensionszusammensetzung. Dutta und Kollegen (2007) zeigten durch einen *in vitro* Versuch mit RAW 264,7-Zellen und SWCNTs und Quarz unterschiedliche Proteinbindungsprofile der getesteten Partikel. Des Weiteren konnten durch die Verwendung Pluronic F127-umhüllter SWCNTs Inhibitionen der Proteinadsorption und eine anti-inflammatorische Wirkung festgestellt werden.

Die Prüfung der Lungenfunktion per nicht-invasiver Head-out Bodyplethysmographie war ein wichtiger Vorteil gegenüber den Vorversuchen, bei der aus zeitlichen Gründen auf die Messung verzichtet werden musste. Eine deutliche Einschränkung der Funktion konnte nur nach  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Aspiration beobachtet werden. Eine bessere Lungenfunktion durch eine möglicherweise verstärkte NP-Agglomeration und ein dadurch effektiverer Partikelclearance bei höherer Rußkonzentration ist unwahrscheinlich. Lim und Mitarbeiter (2012) beobachteten in einer nose-only Inhalationsstudie mit drei verschiedenen Printex®90-Aerosolen unterschiedlicher Agglomeratstadien keine Veränderungen der Lungenfunktion.

Wie bei den Vorversuchen konnte auch beim Einsatz oberflächenfunktionalisierter und nicht-funktionalisierter CBNP bzw. bei der Anpassung der Oberfläche keine Veränderungen der Lungenhistologie nach Hämatoxylin-Eosin und Picrosirius Rot Färbung beobachtet werden. Hinzu kommen keine Veränderungen der Mukussekretion in den Zellen der Bronchiolen. Diese Resultate sprechen für eine geringe toxische Wirkung aller getesteten CBNP. Die Aspiration der Partikel induzierte lediglich intensive Inkorporationen durch Makrophagen. Laut einer *in vitro* Studie von Aam und Fonnum (2007) findet bereits beim Einsatz von  $2,5 \mu\text{g}$  CBNP pro ml (Regal 250R, 35 nm, BET  $60 \text{ m}^2/\text{g}$ ) eine gesteigerte ROS-Produktion in Alveolar-makrophagen statt, welche mit zunehmender Konzentration zunimmt.

Jacobsen und Mitarbeiter (2008) beobachteten ebenfalls eine konzentrationsabhängige ROS-Freisetzung in einer FE1Muta<sup>TM</sup> Mauslungenepithelzell haltigen und freien Lösung nach Printex<sup>®</sup>90 Behandlung (60 nm, BET 338 m<sup>2</sup>/g). In dieser Arbeit wurden außerdem die ROS-Produktionen und die Genotoxizität verschiedener kohlenstoff-basierter NP verglichen. Printex<sup>®</sup>90 zeigte gegenüber SWCNTs und C<sub>60</sub>-Fullerenen eine stärkere ROS-Produktion und DNA-Schädigungen nach 3-stündiger Inkubation. Die geringere Partikelgröße von Printex<sup>®</sup>90 wurde dabei als ein sehr wahrscheinlicher Grund für das starke toxische Potential benannt.

Die Prüfung auf oxidativen Stress im Epithel des Gasaustauschbereichs erfolgte per Immunhistochemie. Getestet wurden u. a. die antioxidativen Enzyme Superoxid-dismutase 2 (SOD2) und Glutathionperoxidase 3 (GPX3). SOD2 katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (Kinnula & Crapo, 2003). Dieses kann in einem zweiten Schritt durch die GPX3 und reduziertem Glutathion zu Wasser und oxidiertem Glutathion umgesetzt werden (Reynaert, 2011). In allen Geweben wurden SOD2 bzw. GPX3 positiv markierte Bronchialepithelzellen und Alveolarsepten beobachtet, ein Schutzmechanismus, begründet durch eine allgemein erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress in der Lunge (Kinnula & Crapo, 2003).

Die BAL-Zytospinpräparate der einzelnen CBNP-Variationen zeigten eine Verringerung des Makrophagenanteils nach Pr90<sub>7µg</sub><sup>-BSA</sup> Aspiration, sowie einen verminderten Einstrom von Lymphozyten durch Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup> und BaP-Pr90<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup> Behandlung. Bourdon und Kollegen (2012) beobachteten hingegen einen intensiven Einstrom von Lymphozyten, Makrophagen bzw. Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten nach intratrachealer Instillation von 18 µg Printex<sup>®</sup>90. Mögliche Ursachen für diese Unterschiede könnten applizierungsspezifisch bzw. durch die um mehr als das doppelte vergrößerte CBNP Konzentration sein. Roursgaard und Kollegen (2011) beobachteten 24 h nach intratrachealer Instillation von 5, 50 und 500 µg DQ12 eine dosisabhängige Infiltration Neutrophiler Granulozyten in der BAL und eine massive Reduktion des Makrophagenanteils beim Einsatz von 5 µg DQ12. Beim Erhöhen der Konzentration auf 50 bzw. 500 µg DQ12 wurde dies jedoch nicht bestätigt. Das komplexe Zusammenspiel zwischen Makrophageninfiltration und Abwanderung während der akuten Phase wurde als ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Resultate vermutet.

Derartige Schwankungen des Makrophagenanteils in der BAL konnten auch bei der Optimierung der Partikelretentionszeit und nach akuter Exposition beobachtet werden. Die BAL-Zytospinpräparate partikelbehandelter Tiere zeigten gleichzeitig eine Inkorporation von CBNP-Agglomeraten und Referenzpartikeln durch Makrophagen. Diese sind der nicht spezifischen Abwehr zuzuordnen. Sie sind in der Lage Zytokine und Enzyme frei zu setzen und mit anderen Zellen über Oberflächenrezeptoren zu interagieren (Sibille & Reynolds, 1990). Barlow und Kollegen (2005) beobachteten sogar eine CBNP induzierte Makrophagenmigration in Richtung eines Typ II Epithelzell-Überstandes (L-2). Diese war im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. den TiO<sub>2</sub>-NP und den größeren TiO<sub>2</sub>- und CB-Partikeln sogar verstärkt.

Gleichbleibende Protein-, Phospholipid- und LDH-Konzentrationen, sowie eine unveränderte antioxidative Kapazität der BAL sprechen für die Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase. Problematisch bei der Bestimmung der oben genannten Parameter ist die Störanfälligkeit der Nachweisverfahren durch die Partikel selbst. Lungensurfactant setzt sich auch aus einer Vielzahl von Proteinen und Lipiden zusammen, welche nach Kontakt mit inhalierten NP an deren Oberfläche binden und gleichzeitig die chemische Funktionalisierung außer Kraft setzen bzw. verändern können (Hamm et al., 1996; Dutta et al., 2007). Das fehlende Wissen über die genauen CBNP-Surfactant-Interaktionen lässt verschiedene Interpretationen zu. Bekannt ist, dass CBNP Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) adsorbieren und damit gleichzeitig zur Partikelaggregation beitragen (Kendall et al., 2004). Dies könnte eine Erklärung für die Agglomerate in den Alveolarmakrophagen und in der BAL sein. Wallace und Kollegen (1992) zeigten andererseits, dass angelagerte Phospholipide durch Phospholipasen von Quarzpartikeln wieder gelöst werden können. Brown und Mitarbeiter (2010) testeten *in vitro* die Interaktion zwischen CBNP (14 und 260 nm) und dem TNF $\alpha$ -Zytokinprotein. CBNP mit einem Durchmesser von 14 nm haben das Protein effektiver gebunden und induzierten unbeschichtet eine höhere intrazelluläre Kalziumkonzentration als die größeren Partikel. Andererseits konnten diese gegenüber 14 nm Partikeln eine verstärkte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) in A549-Epithelzellen induzieren. Eine erhöhte ICAM-1-Expression wurde auch nach TNF $\alpha$ -Beschichtung der 260 nm großen Partikel gegenüber der Kontrolle gemessen, während die kleineren beschichteten Partikel keine Änderung der Expression hervorriefen.

Diese Ergebnisse deuten auf eine TNF $\alpha$ -Inhibierung und eine eingeschränkere Partikelaktivität nach Protein-CBNP-Interaktion hin. Möller und Kollegen (2005) untersuchten die Wirkung der kurzzeitigen intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen in einem *in vitro* Versuch genauer. Getestet wurden u. a. der Phagosomentransport und die Integrität des Zytoskelettes von J774A.1-Makrophagen nach 4-stündiger Behandlung mit Printex<sup>®</sup>90, elementarem Kohlenstoff, Dieselabgaspartikeln und Staub (100 und 320  $\mu$ g Partikel/ml und 1 Million Zellen). Printex<sup>®</sup>90 und der Einsatz von elementarem Kohlenstoff führten zu einem verschlechterten Phagosomentransport und einem unbeweglicheren Zytoskelett in den Makrophagen. Darüber hinaus konnte allein durch die Präsenz von 1 % BSA bzw. 5 % Serum Auswirkungen auf das Zytoskelett abgeschwächt werden. Marano und Mitarbeiter (2011) halten außerdem eine Interaktionen mit Membranrezeptoren und eine damit verbundene spezifische Modulation von Signalwegen für wahrscheinlich, während Ehrenberg und Kollegen (2009) eher unspezifische Wechselwirkungen zwischen Zellen und NP vermuten.

Die intensive Proteinbindung verhinderte die Proteinexpression der SOD2 und GPX3 per Western Blot zu bestimmen. Bereits während der Aufreinigung der Typ II Pneumozyten wurden CBNP-Agglomerate in der Proteinfraction gefunden. Trotz der Freisetzung der gebundenen Proteine während der Elektrophorese erlaubten die stark schwankenden Ergebnisse keine eindeutige Interpretation, da eine Veränderung der CBNP-Protein-Bindung nach Entnahme der Proben nicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund wurde auch auf die Bestimmung des BAL-Zytokinprofils verzichtet.

Die Anzahl isolierbarer Typ II Pneumozyten stieg durch die mit PAKs versehenen Acetylenruß-NP massiv gegenüber der NaCl<sub>70 $\mu$ l</sub><sup>-BSA</sup> Negativkontrolle an. Gleichzeitig zeigte die Messung des Proteinanteils eine Abnahme durch den Referenzpartikel und eine Zunahme durch die Aspiration von NA-Pr90<sub>7 $\mu$ g</sub><sup>+BSA</sup>. Eine verstärkte Typ II Pneumozyten Zellproliferation kann durch Apoptose von Typ I Zellen induziert werden (Adamson & Bowden, 1975). Unveränderte LDH Konzentrationen in der BAL sprechen jedoch gegen eine Apoptose bedingte Typ II Pneumozyten Zellproliferation. Variierende Proteinkonzentrationen könnten durch die Funktionalisierung der CBNP-Oberfläche induziert worden sein. Allerdings wurde der Proteingehalt auch durch den Referenzpartikel beeinflusst.

In der Immunhistologie wurden gleichzeitig leicht verstärkte Zellproliferationen im Bronchialepithel nach  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Aspiration festgestellt.  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  und  $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Applikationen induzierten außerdem eine verstärkte Proliferation der Zellen der Alveolarsepten. Des Weiteren konnte verstärkte Apoptose in Bronchialepithelzellen nach  $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Exposition beobachtet werden. Ursachen für die veränderten Proteinkonzentrationen können nur durch weitere Studien abschließend benannt werden. Dabei sollten CBNP-Funktionalisierungen und deren Interaktionen mit einzelnen Surfactantkomponenten, sowie bereits vorhandene bzw. modifizierte Partikel-Aufnahmemechanismen durch Zellen des Gasaustauschbereiches im Mittelpunkt stehen. Sydlik und Kollegen (2006) untersuchten beispielsweise den Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation in Lungenepithelzellen der Ratte (RLE-6TN) nach Printex<sup>®</sup>90 Behandlung. Beide Mechanismen wurden durch Printex<sup>®</sup>90 unabhängig voneinander induziert.

Bei der Analyse verschiedener Typ II Pneumozyten mRNA-Expressionen antioxidativ wirksamer Enzyme (SOD1, SOD2, SOD3, GR, GPX3, GPX4 und KAT), der Surfactantproteine (SP-A und SP-D) und der Schlüsselenzyme der Surfactantsynthese (CK $\alpha$ , CK $\beta$  und CTP $\alpha$ ) zeigte sich nach CBNP Aspiration vereinzelt reduzierte mRNA-Expressionen. Dies könnten Hinweise auf vorangegangenen oxidativen Stress, intensive Partikelopsonierung durch hydrophile Surfactantproteine und Störungen des Surfactantgleichgewichtes im Gasaustauschbereich nach 3-tägiger Partikelretentionszeit sein. Diabaté und Mitarbeiter (2011) beobachteten *in vitro* eine gesteigert ROS-Freisetzung und eine gesenkte intrazelluläre Glutathionkonzentration in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) nach Printex<sup>®</sup>90 Applikation. Garza und Kollegen (2008) untersuchten die Freisetzung von ROS und die Zytotoxizität von Partikeln mit unterschiedlicher PAK-Zusammensetzung (MWCNT-Aggregate, Dieselruß, Black Carbon etc.). Die immortalisierten humanen A549-Zellen zeigten partikelabhängige ROS-Produktionen und verminderte Zellviabilität. Der Anteil der PAK spielte dabei jedoch keine Rolle. In einer weiteren *in vitro* Studie wurde die ROS-Freisetzung nach Verwendung verschiedener Partikelsuspensionsmedien analysiert. Geprüft wurden u. a. SWCNTs und Printex<sup>®</sup>90 in FCS freiem und FCS haltigem Medium, sowie DPPC vorbehandelte Partikel (Herzog et al., 2009).

Die Versuche zeigten eine geringere ROS-Produktion durch FCS-Zugabe und eine gesteigerte intrazelluläre Produktion nach DPPC Behandlung. Vermindert SP-A und -D mRNA-Expressionen weisen auf ein Ungleichgewicht der Surfactantproteinsynthese. Beide Proteine besitzen opsonierende Wirkung und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie binden potentiell gesundheitsschädigende Substanzen zur Förderung der Partikelaufnahme durch phagozytierende Zellen (Wright, 1997). Salvador-Morales und Kollegen (2007) konnten eine selektive SP-A und -D Bindung an Kohlenstoffnanotubes in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration und Partikelcharge nachweisen. Eine *in vitro* Experiment von Ruge und Mitarbeitern (2011) zeigte, dass die Partikelaufnahme verschieden umhüllter Magnetit-NP (Stärke, Chitosan, Phosphatidylcholin etc.) durch SP-A Vorbehandlung effektiver verläuft, während Albumin den Prozess mindert. Kendall und Kollegen (2013) beobachteten ein ähnliches Verhalten durch die Anwesenheit von SP-D. Im Vergleich zu isolierten Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen der Lunge SP-D defizienter Mäuse konnte eine intensivere NP-Aufnahme durch Zellen des C57BL/6 Wildtyps beobachtet werden. Außerdem wurde die Bindung zwischen ausgewählten Proteinen wie SP-D, BSA und Fibrinogen bzw. dem Phospholipid DPPC anhand drei verschiedener CBNP geprüft (Kendall et al., 2004). Verwendet wurden zwei NP mit einer Größe von je 25 nm und einer oxidierten (R400) bzw. nicht-oxidierten (R330) Oberfläche und ein Partikel mit einer nicht-oxidierten Oberfläche und einer Partikelgröße von 75 nm (M120). SP-D wurde stets vollständig an die Partikel gebunden. Die Partikelagglomeration wurde durch DPPC stärker begünstigt als durch BSA und Fibrinogen. Die DPPC Reduktion im Medium war außerdem oberflächen- und größenabhängig. Ein Abbau von CBNP-Agglomeraten bis hin zu ihren Primärpartikeln im inneren der Lunge wurde ebenfalls diskutiert aber als unwahrscheinlich eingestuft (Levy et al., 2012).

Nach Analyse der Typ II Pneumozyten mRNA-Expression von IL-6 und dessen Rezeptors zeigte sich lediglich eine verstärkte Expression des Rezeptors nach  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$  Aspiration. Allerdings konnte nach  $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Behandlung eine ähnliche Tendenz beobachtet werden, was wiederum gegen einen Entzündungsprozess spricht.

Der Vergleich der Ergebnisse chemisch funktionalisierter CBNP zeigte keine Veränderungen der Lungenstruktur und eine nur geringfügig beeinträchtigte Lungenhomöostase, welche sich vor allem durch eine veränderte mRNA-Expression antioxidativer Enzyme, Surfactantproteine und Enzyme der Surfactantsynthese in Typ II Pneumozyten äußerte. Diese Ergebnisse sprechen für einen effektiven Clearancemechanismus des Alveolarbereichs, wodurch das mögliche toxische Potential aller getesteten CBNP in der Lunge limitiert wurde. Die Modifikation des Suspendierungsmittels, sowie die Anpassung der Gesamtpartikeloberfläche zeigten ebenfalls moderate Effekte. Insbesondere BSA, welches als Stabilisator für CBNP-Suspensionen verwendet wurde, sollte durch eine physiologischere Substanz im Langzeitversuch ausgetauscht werden. Denkbar ist hier die Verwendung zellfreier BAL. Außerdem muss die Protein- und Lipidaffinität der NP-Oberfläche, sowie der mögliche Austausch chemischer Funktionalisierungen in biologischen Fluiden genauer erfasst werden.

### 5.3 Einordnung der Ergebnisse zu den Beiträgen der Verbundpartner

Nach Isolation CBNP-behandelter Tracheen am Institut für Anatomie der Universität Lübeck wurde der zilienvermittelte Transport, die zelltypspezifische Aufnahme in Trachealepithelzellen und deren Aktivierung bzw. Schädigung näher betrachtet. Insgesamt zeigte sich eine Grundtoxizität aller getesteten Partikel, welche zu einem lokalen jedoch schnell regenerierenden Zelluntergang führten. Interessanterweise zeigte sich eine erhöhte Muc5ac mRNA-Expression nach dem Einsatz von 10 und 30 µg Acetylenruß mit PAKs pro ml nach 24 h. Eine veränderte Muc5ac-Expression wird mit einer veränderten Mukussekretion in Verbindung gebracht (Rose & Voynow, 2006). Eine verstärkte Sekretion konnte jedoch nach oropharyngealer Aspiration von PAK-AR<sub>7µg</sub><sup>+BSA</sup> und PAK-AR<sub>15µg</sub><sup>+BSA</sup> in den Bronchien nicht nachgewiesen werden. NA- und BaP-funktionalisiertes Printex<sup>®</sup>90 rief bei beiden Konzentrationen keine Veränderung hervor. Lediglich die nicht-funktionalisierten CBNP senkten die mRNA-Expression bei einer Partikelkonzentration von 30 µg Printex<sup>®</sup>90 pro ml (König, 2014). Anhand isolierter Bronchien und Bronchiolen erfolgte die Untersuchung der Zellen hinsichtlich Nekrose, Apoptose, Proliferationsverhalten, Induktion pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Zytokine und die Bestimmung der Schwellendosis. Diese Versuche erfolgten am Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften in Borstel. Zur Analyse der Zellnekrose wurden folgende CBNP-Dosen im LDH-Assay getestet: 0,1; 1 und 10 µg CBNP pro ml. Printex<sup>®</sup>90, Acetylenruß mit PAKs, BaP- und NA-funktionalisierte Printex<sup>®</sup>90 zeigten dabei keine verstärkte LDH Konzentration 24 h nach Exposition. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die mRNA-Expressionsanalyse diverser Zytokine (IL-1β; IL-6 und TNFα), der Keratinozyt Chemokin ELISA und IL-6- bzw. MIP-1-Protein CBAs (engl. cytometric bead array) (Fehrenbach, 2014). Unveränderte LDH-Konzentrationen in der BAL, sowie gleichbleibende IL-6 mRNA-Expressionen in Typ II Pneumozyten wurden auch nach oropharyngealer Aspiration während der 3-tägigen CBNP-Exposition beobachtet.

Am Fraunhofer Institut Hannover erfolgte die Toxizitätsbestimmung der CBNP durch Zellviabilitätsmessungen (WST-8-, Neutralrot-Assay etc.; 24 und 48 h Inkubation) Genotoxizitätstests (alkalischer und oxidativer Comet Assay; 24 h Inkubation) und die Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER; 24, 48 und 120 h Inkubation) mittels A549, Calu-3 und 16HBE14o-Zelllinien.



Getestet wurden 0,1; 1; 10 und 100 ng und 1; 10; 25 und 50 µg CBNP pro ml. Wenn sich Effekte zeigten, dann vor allem bei den beiden höchsten CBNP Konzentrationen. Zusätzlich erfolgte die Anfertigung von Precision-cut lung slices (PCLS) aus BALB/c-Mauslungen und Brown Norway Ratten. Diese wurden mit Partikelkonzentrationen von 0,8 bis zu 75 µg pro ml für 24 h inkubiert. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität per WST-1 Test und die Messung der IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  (BALB/c-Mäuse) bzw. die CXXL1 Konzentrationen (Brown Norway Ratte). Dabei konnte bei beiden Präparaten eine Cytokin- und Chemokinfreisetzung beobachtet werden. Eine pro-inflammatorische Antwort wurde nach dem Einsatz von 50 µg Acetylenruß mit PAKs nur in BALB/c-PCLS nachgewiesen. BaP- und NA- funktionalisiertes Printex®90 induzierten eine höhere Anzahl toter Zellkerne. Die Zellvitalität wurde jedoch durch keinen der getesteten Partikel beeinträchtigt.

Nach dem Vergleich aller Projektergebnisse wurden die Partikel mit dem stärksten toxischen Potential ausgewählt und in einem abschließenden nose-only Inhalationsversuch an Wistar-Ratten getestet. Zu den Partikeln gehörten Acetylenruß mit PAKs und BaP funktionalisiertes Printex®90. Nicht-funktionalisierte CBNP (Referenzpartikel) und die Exposition mit reiner Luft wurden parallel getestet. Die Partikelkonzentration betrug 6 mg pro cm<sup>3</sup>. Die Inhalation erfolgte über 10 Expositionstage, 6 h pro Tag und 5 d pro Woche. Acetylenruß mit PAKs zeigten das stärkste toxische Potential, welches sich durch ein vergrößertes relatives Lungengewicht, Genotoxizität, eine sehr geringe aber vorhandene interstitielle Anreicherung partikelhaltiger Makrophagen und eine geringfügig verstärkte bronchioalveoläre Hyperplasie äußerte. Diese histologischen Veränderungen konnten auch 14 d nach Abschluss des Inhalationsversuches nachgewiesen werden. Die Funktionalisierung mit PAKs könnte zu einer verbesserten Aufnahme der Partikel in die Zellen geführt haben. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt. Nicht-funktionalisiertes und BaP-funktionalisiertes Printex®90 zeigten genotoxisches Potential im Comet-Assay. Parameter der BAL, wie z. B. der Anteil an Neutrophilen Granulozyten oder die LDH- bzw. Gesamtproteinkonzentrationen wurden jedoch durch keinen der Partikel verändert (Hansen, 2014). Im Vergleich zur oropharyngealen Aspiration konnten identische Ergebnisse wie z. B. unveränderte LDH- und Proteinkonzentrationen der BAL festgestellt werden.

Das BAL-Zellprofil zeigte jedoch nach  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Aspiration eine verringerte Gesamtzellzahl, wie sie höchstwahrscheinlich durch eine intensive Zu- und Abwanderung von Makrophagen induziert wurde (Roursgaard et al., 2011). Dies wurde nach der Inhalationsstudie nicht beobachtet.

Die Ergebnisse aller fünf Arbeitsgruppen unterstreichen die Notwendigkeit der mehrstufigen Risikoanalyse in den verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes durch gezielte *in vitro-in vivo*-Untersuchungen in Kombination mit einer streng kontrollierten Synthese und Charakterisierung oberflächenfunktionalisierter CBNP und deren Suspensionen. Nur die Erfassung aller Testsystemergebnisse konnte zeigen, dass oberflächenfunktionalisierte CBNP in der Lage sind den Metabolismus verschiedenster Lungenzellen zu beeinflussen. Das toxische Potential zeigte sich jedoch bei niedriger CBNP Konzentration im Akutexperiment von der Trachea bis in den alveolaren Bereich als sehr gering.

#### 5.4 Pilotstudie zur subchronischen Carbon Black Nanopartikel Exposition

Für die Toxizitätsbestimmung von CBNP sind weitere subchronische bzw. chronische Expositionsmodelle essentiell. Nur durch Versuche mit längeren Expositionszeiten und der mehrfachen Aufnahme realistischer CBNP-Dosen kann die Gesundheitsgefährdung abschließend beurteilt werden. Während der Pilotstudie wurden den BALB/c-Mäusen über drei Monate, in den Wochen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 und 12, je 7 µg Pr90<sup>-BSA</sup>, DQ12<sup>-BSA</sup> bzw. 70 µl H<sub>2</sub>O<sup>-BSA</sup> oropharyngeal appliziert. Um die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten wurde auf die Verwendung einer zweiten Negativkontrolle verzichtet.

Das Körpergewicht wurde durch keinen der getesteten Partikel verändert. Lediglich bei den DQ12<sup>-BSA</sup> behandelten Mäusen kam es zu einer leichten Verschlechterung des Allgemeinzustandes kurz vor Ende der Versuche. Interessanterweise blieb jedoch die Lungenfunktion bei gleichzeitig vermehrter Kollageneinlagerung und nach Deformierung der Alveolarsepten unbeeinflusst, während Pr90<sup>-BSA</sup> Mehrfachaspiration gegenüber dem Kurzzeitexperiment die schlechtere Lungenfunktion trotz geringfügiger morphologischer Veränderungen wie z. B. vereinzelten Kollageneinlagerungen um Bronchiolen und Blutgefäße hervorrief.

Der Vergleich der Lungenfunktionen partikelbehandelter Tiere und der Negativkontrolle ergab wiederum keine Funktionseinschränkung, was für eine Kompensation durch ein intaktes Clearancesystem des Respirationstraktes spricht. Dies wird durch eine unveränderte Mukussekretion und die nur geringfügig erhöhte Proliferation im Bronchialepithel und in den Alveolarsepten und durch eine unveränderte Apoptoseaktivität bekräftigt. Derartige NP induzierte Effekt wurden bereits durch Wang und Kollegen beschrieben. Sie testeten die Wirkung von SWCNTs auf humanen Lungenfibroblasten. Der Versuch mit der Zellkultur zeigte ebenfalls eine Stimulation der Zellproliferation und Kollagenproduktion ohne Zellschädigung (Wang et al., 2010).

Eine gesteigerte SOD2- und GPX3-Expression in den Zellen der Alveolarsepten und im Bronchialepithel konnte während der Langzeitexposition in allen Versuchstiergruppen beobachtet werden. Im Vergleich zum Kurzzeitexperiment wurde sogar eine leicht gesteigerte Expression der beiden antioxidativ wirkenden Enzyme verzeichnet. Dies deutet darauf hin, dass der oxidative Stress im subchronischen Experiment zugenommen hat. Eine Ursache dafür könnte die Mehrfachaspiration der Suspensionen sein.

Andererseits zeigten Aam und Fonum anhand verschiedener CBNP Konzentrationen eine dosisabhängige ROS-Freisetzung durch isolierte Alveolarmakrophagen (2007).

Im Kurzzeitexperiment wurde auf die Bestimmung der IgE Konzentration auf Grund der geringen CBNP Konzentration und der starken Pufferwirkung des Blutes verzichtet. Die Ergebnisse des Langzeitexperimentes zeigten ebenfalls keine Veränderungen nach Partikelaspiration. Es ist anzunehmen, dass auch hier die eingesetzten Konzentrationen zu gering waren um die IgE Konzentration im Blut messbar zu erhöhen. Dennoch ist es für zukünftige Versuche wichtig den Aspekt der CBNP-Verteilung bzw. Deposition in Sekundärorganen wie z. B. in Leber, Niere, Herz, Milz und Gehirn durch mikroskopische Untersuchungen näher zu untersuchen.

Bei Betrachtung der BAL-Zytospinpräparate konnte festgestellt werden, dass der Anteil an Neutrophilen Granulozyten sank und die Anzahl der Makrophagen durch die mehrfache Aspiration nicht-funktionalisierter CBNP im Vergleich zum Akutexperiment stieg. Außerdem konnte eine deutlich verstärkte Vakuolenbildung im Zytoplasma der Alveolarmakrophagen nach Partikelaufnahme verzeichnet werden, was auf eine intensivierte alveoläre Clearance hindeutet.

Die mehrfache  $\text{Pr90}^{\text{-BSA}}$  Aspiration führte zusätzlich zu einer Erhöhung des BAL-Phospholipidgehalts gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}^{\text{-BSA}}$  Negativkontrolle und einer Verringerung des Gesamtproteinanteils im Vergleich zur Einfachapplikation im Akutexperiment. Die LDH Konzentration blieb wie im Kurzzeitversuch unverändert.

Der erhöhte Anteil an Phospholipiden kann durch eine verschlechterte Lungenfunktion begründet sein. Untersuchungen zeigten, dass die Dehnung der Alveolarzellen direkten Einfluss auf die Freisetzung von Surfactant ausübt (Nicholas, 1993). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, da es auch nach BAL-Gewinnung und während der Probenaufarbeitung sowie während der Messung zu Bindungen zwischen CBNP und Surfactantkomponenten wie Zytokinen und Enzymen kommen kann. Demzufolge können unveränderte Protein- und LDH Konzentrationen zwei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass keine Zellschädigung im terminalen Bereich des Respirationstrakts vorliegt. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die zu testenden CBNP selbst die Messergebnisse durch Interaktion mit der zu messenden Agens bzw. Nachweissubstanz beeinträchtigten oder die Messung durch Lichtabsorption stören (Dhawan & Sharma, 2010; Holder et al., 2012).

Die unveränderte Zellzahl der isolierbaren Typ II Pneumozyten im Langzeitexperiment spricht für eine ungestörte Lungenhomöostase, während der erhöhte Anteil an Proteinen in den Zellen nach  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  und  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  Exposition gegenüber dem Kurzzeitversuch auf eine Beeinflussung des Typ II Pneumozyten-Metabolismus hindeuten.

Anders als bei der immunhistochemisch nachgewiesenen SOD2- und GPX3-Proteinexpressionen konnten keine veränderten mRNA-Expressionen antioxidativer Enzyme in den Typ II Pneumozyten beobachtet werden, was gegen Partikel induzierten oxidativen Stress in diesen Zellen spricht.

Des Weiteren kam es zu reduzierten SP-D mRNA-Expressionen im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  Mehrfachaspiration und verminderten Expressionen von Enzymen der Surfactantsynthese gegenüber der Einfachexposition bzw.  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  Mehrfachaspiration, während die BAL-Phospholipidkonzentration gegenüber der Mehrfachapplikation von  $\text{H}_2\text{O}^{-\text{BSA}}$  erhöht wurde. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch nach Mehrfacheinsatz von  $\text{DQ12}^{-\text{BSA}}$  beobachtet werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können lautzeitigem Kenntnisstand nicht abschließend erklärt werden.

Die CBNP und der Referenzpartikel zeigten außerdem im Vergleich zur Einfachexposition eine geringere mRNA-Expression von IL-6 und dessen Rezeptor. Diese Ergebnisse deuten auf eine vorangegangene Aktivierung bzw. Rekrutierung von Leukozyten und eine intensive Differenzierung von Makrophagen (Akdis et al., 2011).

Insgesamt spiegelt der subchronische Versuchsaufbau die Aufnahme von Partikeln im Alltag besser wieder als das Kurzzeitexperiment. Die Verschlechterung einzelner Parameter, wie z. B. die Variierung des Phospholipidgehaltes in der BAL oder beginnende morphologische Veränderungen belegen die Wichtigkeit dieser und weiterer Untersuchungen, da das Gesundheitsrisiko nur durch wiederholte Partikelaufnahme genau abgeschätzt werden kann.

## 6. Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung oberflächenfunktionalisierter CBNP auf den terminalen Respirationstrakt, insbesondere auf Typ II Pneumozyten, zu untersuchen. Zusätzlich sollten die gewonnenen Ergebnisse mit den Resultaten der anderen Arbeitsgruppen des Verbundprojektes „Carbon Black“ verglichen werden, um abschließend ein valides Toxizitätsprüfprotokoll für bestehende und neu entwickelte kohlenstoffbasierte NP zu erstellen.

Bedingt durch den komplexen Aufbau der Lunge und den damit verbundenen variierenden Partikeldepositions Mustern, den verschiedenen Clearance-Mechanismen und dem noch fehlenden Wissen über die Wechselwirkungen zwischen der CBNP-Oberfläche und biologischen Fluiden bzw. Epithelzellen der Lunge ist es wichtig empirische *in vivo* Untersuchungen bei der Erstellung eines Testprotokolls einzubeziehen. Die zentrale Hypothese dieser Arbeit lautete:

**Die chemische Funktionalisierung der CBNP-Oberfläche ist ein entscheidender Faktor hinsichtlich der toxischen Wirksamkeit von CBNP im terminalen Respirationstrakt, insbesondere auf Typ II Pneumozyten.**

Die Inhalation funktionalisierter CBNP wurde mittels oropharyngealer Aspiration am Mausmodell simuliert. Nach definierten Partikeldepositionszeiten wurden Einschränkungen der Lungenfunktion durch die nicht invasive Head-out Bodyplethysmographie geprüft. Histologische und immunohistochemische Methoden sollten Aufschluss über strukturelle Veränderungen der Lunge geben. Die im terminalen Bereich der Lunge präsenten Typ II Pneumozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von Lungenfunktion und Struktur. Aus diesem Grund stand die Protein- und mRNA-Analyse ausgewählter Antioxidantien, Surfactantproteine, Zytokine und Enzyme der Surfactantsynthese isolierter Typ II Pneumozyten im Vordergrund der Untersuchungen. Veränderungen der Lungenhomöostase wurden des Weiteren durch die Bestimmung der qualitativen und quantitativen Zellzusammensetzung und durch Protein- und Phospholipid-Konzentrationsmessungen der bronchoalveolären Lavage ermittelt.

Auf Grund effektiver Clearancemechanismen in den einzelnen Abschnitten des Respirationstraktes und dem noch fehlenden Wissen über die Wechselwirkungen zwischen Oberflächenfunktionalisierung und NP *in vivo* ist eine abschließende Bewertung einzelner CBNP-Funktionalisierungen und die Erstellung eines genormten Prüfprotokolls derzeit noch nicht möglich. Einschränkungen der Lungenfunktion wurden durch das gut aufeinander abgestimmte Abwehrsystem der Lunge minimiert.

Dennoch kann die Arbeitshypothese bestätigt werden. Die chemische Funktionalisierung hat neben der Partikelform, der Dosis und der Größe der Partikeloberfläche entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von CBNP auf den terminalen Respirationstrakt, insbesondere auf Typ II Pneumozyten.

Die empirisch ermittelten Daten spiegelten sich auch in den Ergebnissen der anderen, am Verbundprojekt beteiligten Arbeitsgruppen wieder. Außerdem sind sie eine wichtige Grundlage für weitere *in vivo-in vitro*-Kombinationsuntersuchungen zu CBNP-Langzeitexpositionen, da die Wahrscheinlichkeit einer immer wiederkehrenden Inhalation von CBNP höher ist als eine einmalige Partikelaufnahme. Dies kann das toxische Potential erhöhen, da es zu Einschränkungen bzw. einem Ausfall der Selbstreinigungsmechanismen der Lungen kommen kann.

Darüber hinaus sollte der Aspekt funktionseingeschränkter Lungen wie er z. B. bei bestehendem allergischen Asthma vorliegt und der Einsatz Allergen besetzter CBNP in die Untersuchungen einbezogen werden, da die Anzahl allergischer Erkrankungen in der Bevölkerung stets zunimmt. Parallel muss der NP-Anteil in der Atmosphäre schnell und unkompliziert detektierbar gemacht werden, um den genauen Eintrag in die Umwelt und mögliche Interaktionen besser abschätzen zu können und wenn nötig einzudämmen.

## 7. Zusammenfassung

Nachhaltige Schädigungen der Lungen durch den Eintrag von Schadstoffen über die Außenluft sind unumstritten. In den letzten Jahrzehnten konnte der Eintrag größerer Schadstoffmengen in die Umwelt in Industrieländern wie Deutschland enorm verringert werden. Dennoch kommt es immer wieder zu Überschreitungen gesetzlich vorgeschriebener Höchstwerte für Feinstaub in Ballungsgebieten. Gegenwärtig verhindern komplizierte Analysemethoden eine flächendeckende Prüfung der Zusammensetzung der feinsten Partikelfraktion. Die verstärkte Einsatzmenge funktionalisierter CBNP in zahlreichen Bereichen des Alltags steigert zusätzlich das Risiko einer ungewünschten Freisetzung in die Umgebung und erhöht so gleichzeitig die Gefahr Lungenerkrankungen hervorzurufen bzw. diese zu begünstigen.

Um zur toxikologischen Risikobewertung von CBNP beizutragen wurden in der vorliegenden Studie nicht-funktionalisierte ( $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ), oberflächenfunktionalisierte ( $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAK-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ) und oberflächenadjustierte CBNP ( $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ) hinsichtlich ihrer Toxizität auf den terminalen Bereich der Lungen im BALB/c-Mausmodell geprüft und mit den Ergebnissen eines Referenzpartikels ( $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ) und mehrerer Negativkontrollen ( $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ ) verglichen. Die Verabreichung aller Suspensionen erfolgte per oropharyngealer Aspiration. Die Bestimmung der Lungenfunktion folgte nach 2-tägiger Partikelretentionszeit durch nicht-invasive Head-out Bodyplethysmographie. Am Tag drei wurden die Lungen für histologische Untersuchungen bzw. für die Isolation der stoffwechselaktiven Typ II Pneumozyten entnommen. Parallel zur Zellisolierung erfolgte die Gewinnung der BAL.

Anhand eines Vorversuches wurde zunächst die optimale Partikelretentionszeit von drei Tagen ermittelt. Während des Einsatzes verschiedener CBNP im Kurzzeitexperiment konnten anschließend keine massiven strukturellen Veränderungen bzw. funktionellen Einschränkungen des terminalen Respirationstraktes durch die Oberflächenfunktionalisierungen beobachtet werden. Dies spricht für einen effektiven, reibungslosen Clearancemechanismus durch Makrophagen im Alveolarbereich. Dennoch gab es erste Hinweise auf Störung der Lungenhomöostase. Insbesondere die mRNA-Expression verschiedener Antioxidantien, sowie die Expression der Surfactantproteine und Schlüsselenzymen der Surfactantsynthese zeigten vereinzelte Abweichungen gegenüber den Kontrollen.



Die Ergebnisse der Mehrfachapplikation nicht-funktionalisierter CBNP während der Pilotstudie zur Langzeitexposition weisen auf eine eingeschränkere Clearance hin. Gegenüber den Kurzzeitversuchen zeigten sich beispielsweise vermehrte Kollageneinlagerungen entlang der Bronchiolen und Blutgefäße sowie erhöhter Protein- und Phospholipidkonzentrationen in der BAL nach mehrfacher  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  Aspiration gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  Negativkontrolle.

Immer wiederkehrende Berichte über gesundheitsgefährdende Verunreinigungen der Luft und der stets wachsende Markt für kohlenstoffbasierte NP fordern weitere toxikologische Begutachtungen und eine Weiterentwicklung der bestehenden Mess- und Analysemethoden für Umweltproben.

Weitere Tests mit mehrfachen oropharyngealen Aspirationen geringer Dosen oberflächenfunktionalisierter CBNP sind nötig um Langzeiteffekte besser beurteilen zu können. Dabei muss neben strukturellen und funktionellen Veränderungen der Lunge auch die Translokation der chemisch funktionalisierten CBNP in andere Organe geprüft und damit verbundene Effekte in die toxikologische Bewertung einbezogen werden. Die zunehmende Anzahl von Lungenerkrankungen in der Bevölkerung macht es außerdem nötig vorgeschädigte Lungen in die Untersuchungen einzubeziehen. Eine weitere Herausforderung künftiger Studien wird es sein, die genauen Interaktionen zwischen den chemisch funktionalisierten Partikeloberflächen und biologischen Fluiden zu bestimmen und so grundlegende Wirkmechanismen *in vivo* aufzudecken.

## 8. Summary

Sustained damages of lungs caused by the inhalation of air pollutants are undisputed. Within the last decades in industrialized countries like Germany the emission of harmful substances has been greatly reduced. Nevertheless, repeated exceedances of maximum limits for particulate matter in urban areas have been measured. Currently complicated particle analyses prevent comprehensive examinations of the fine particle fraction composition in the air. In addition the increasing use of functionalized CBNP in numerous fields of daily life increases the risk of unwanted release into the environment and the outcome of lung diseases. Hence the toxicological potential of CBNP on the terminal region of the lung has been analyzed using BALB/c mice and non-functionalized ( $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ), surface-functionalized ( $\text{NA-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{BaP-Pr90}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ,  $\text{PAH-AR}_{7\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ) and surface-adjusted CBNP ( $\text{PAK-AR}_{15\mu\text{g}}^{+\text{BSA}}$ ), reference particles ( $\text{DQ12}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$ ) and several negative controls ( $\text{NaCl}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{+\text{BSA}}$ ). The administrations of the suspensions were done by oropharyngeal aspiration. Pulmonary function measurements were performed after a particle retention time of 2 days by noninvasive head-out body plethysmography. On day three lungs were taken for histological examinations and type II pneumocyte isolation. Parallel to cell isolations BAL were collected. On the basis of a first experiment, the optimal particle retention time of 3 days was determined. During the use of different CBNP in short-term experiment, no massive structural changes or functional limitations of the terminal respiratory tract by surface non-functionalized and functionalized particles could be observed. This argues for an effective particle clearance by macrophages within the alveolar region. However, there were also indications of lung homeostasis disturbance. In particular, the mRNA-expression of various antioxidants, as well as the expression of surfactant proteins and key enzymes of surfactant synthesis revealed scattered deviations from the controls.

The results of the multiple applications of non-functionalized CBNP during the long-term exposure indicate a more limited clearance. As reflected by increased collagen deposits along the bronchioles and blood vessels and increased protein and phospholipid concentrations in BAL-samples after multiple  $\text{Pr90}_{7\mu\text{g}}^{-\text{BSA}}$  aspiration towards the  $\text{H}_2\text{O}_{70\mu\text{l}}^{-\text{BSA}}$  negative control.

Recurring reports of harmful air contaminations and the growing market for carbon-based NP require further toxicological assessments and development of existing measurement and analysis for environmental samples. Further tests with multiple oropharyngeal aspirations of low doses surface functionalized CBNP are needed to assess long-term effects. In addition to structural and functional changes in the lungs these toxicological evaluations have to verify the translocation of chemically functionalized CBNP to other organs and translocation associated effects. Further the increasing number of lung diseases in the population makes it necessary to include investigations on pre-damaged lungs. Another challenge of future studies will be the determination of precise interactions between chemical functionalized particle surfaces and biological fluids to get information about basic *in vivo* mechanisms.

## 9. Literaturverzeichnis

- Aam, B. B. & Fonnum, F., 2007. Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. *Arch. Toxicol.* 81:441-446.
- Adamson, I. Y. R. & Bowden, D. H., 1975. Derivation of Type I epithelium from Type II cells in the developing rat lung. *Lab. Invest.* 32:736-745.
- Agassandian, M. & Mallampalli, R. K., 2013. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831:612-25.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van de Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127:701-721.e70.
- Albert, R. E., Lippmann, M., Briscoe, W., 1969. The characteristics of bronchial clearance in humans and the effect of cigarette smoking. *Arch. Environ. Health* 18:738-755.
- Andreassen, S., Steimle, K. L., Mogensen, M. L., Bernardino de la Serna, J., Rees, S., Karbing, D. S., 2010. The effect of tissue elastic properties and surfactant on alveolar stability. *J. Appl. Physiol.* 109:1369-1377.
- Aoyama, C., Liao, H., Ishidate, K., 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 43:266–281.
- Asgharian, B., Wood, R., Schlesinger, R. B., 1995. Empirical modeling of particle deposition in the alveolar region of the lungs: a basis for interspecies extrapolation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27:232-238.
- BAAQMD, Bay Area Air Quality Management District, 2010. *Ultrafine Particulate Matter Study in the San Francisco Bay Area. Part I Study Plan.* [pdf] San Francisco: BAAQMD. Verfügbar unter: <<http://www.baaqmd.gov/Search.aspx?q=ultrafine>> [zuletzt abgerufen am 2. Oktober 2014].

- Bai, R., Zhang, L., Liu, Y., Meng, L., Wang, L., Wu, Y., Li, W., Ge, C., Le Guyader, L., Chen, C., 2010. Pulmonary responses to printer toner particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol. Lett.* 199: 288-300.
- Barlow, P. G., Clouter-Baker, A., Donaldson, K., MacCallum, J., Stone, V., 2005. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* 2:11.
- Bartlett, G. R., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234:466-468.
- Bastacky, J., Lee, C. Y., Goerke, J., Koushafar, H., Yager, D., Kenaga, L., Speed, T. P., Chen, Y., Clements, J. A., 1995. Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J. Appl. Physiol.* 79: 1615-1628.
- Beule, A. G., 2010. Funktionen und Funktionsstörungen der respiratorischen Schleimhaut der Nase und der Nasennebenhöhlen. *Laryngo Rhino Otol.* 89:15-34.
- Bezemer, G. F. G., Bauer, S. M., Oberdörster, G., Breysse, P. N., Pieters, R. H. H., Georas, S. N., Williams, M. A., 2011. Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles in vivo. *J. Innate Immun.* 3:150-166.
- Bikiarisa, D. N., Achilias, D. S., Giliopoulou, D. J., Karayannidis, G. P., 2006. Effect of activated carbon black nanoparticles on solid state polymerization of poly(ethylene terephthalate). *Eur. Polym. J.* 42:3190-3201.
- BMU, Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 2003. *Episodenhafte PM<sub>10</sub>-Belastung in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 2000 bis 2003.* [pdf] Berlin: BMU. Verfügbar unter: <<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/episodenhafte-pm10-belastung-in-bundesrepublik>> [zuletzt abgerufen am 2. Oktober 2014].
- BMU, Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 2011. *Verantwortlicher Umgang mit Nanotechnologien, Bericht und Empfehlungen der NanoKommission 2011.* [pdf] Berlin: BMU. Verfügbar unter: <[nano.dguv.de/fileadmin/user\\_upload/.../nano\\_schlussbericht\\_2011\\_bf.pdf](http://nano.dguv.de/fileadmin/user_upload/.../nano_schlussbericht_2011_bf.pdf)> [zuletzt abgerufen am 14. September 2014].

Bockhorn, H., 2014. *Teilprojekt 1 - Endbericht Carbon Black*. Universität Karlsruhe Institut für Technische Chemie und Polymerchemie.

Bourdon, J. A., Saber, A. T., Halappanavar, S., Jackson, P. A., Wu, D., Hougaard, K. S., Jacobsen, N. R., Williams, A., Vogel, U., Wallin, H., Yauk, C. L., 2012a. Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung. *Environ. Mol. Mutagen.* 53:462-468.

Bourdon, J. A., Saber, A. T., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Madsen, A. M., Lamson, J. S., Wallin, H., Møller, P., Loft, S., Yauk, C. L., Vogel, U. B., 2012b. Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. *Part. Fibre Toxicol.* 9:5.

Bourdon, J. A., Williams, A., Kuo, B., Moffat, I., White, P. A., Halappanavar, S., Vogel, U., Wallin, H., Yauk, C. L., 2013. Gene expression profiling to identify potentially relevant disease outcomes and support human health risk assessment for carbon black nanoparticle exposure. *Toxicology* 303:83-93.

Brain, J. D., Knudson, D. E., Sorokin, S. P., Davis, M. A., 1976. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ. Res.* 11:13-33.

Braun, J. R. & Willnow, T. E., 1996. Die "Knockout" Maus als Krankheitsmodell - Prinzipien und klinische Relevanz. *Dt. Ärztebl.* 93:A1765-1769.

Brown, D. M., Dickson, C., Duncan, P., Al-Attili, F., Stone, V., 2010. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology* 21:215104.

BUND, Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, o. J. *Was bedeutet "Nano"?* [Online] Verfügbar unter: <[http://www.bund.net/themen\\_und\\_projekte/nanotechnologie/nanomaterialien/](http://www.bund.net/themen_und_projekte/nanotechnologie/nanomaterialien/)> [zuletzt abgerufen am 14. September 2014].

Canadian Legal Information Institute, 2014. *Food and Drug Regulations, C.R.C., c. 870*. [Online] Verfügbar unter: <<http://www.canlii.org/en/ca/laws/regu/crc-c-870/latest/crc-c-870.html>> [zuletzt abgerufen am 1. Oktober 2014].

- Ceresana, 2013. *Marktstudie Carbon Black (Ruß) (UC-5605)*. [Online] Verfügbar unter: <<http://www.ceresana.com/de/marktstudien/chemikalien/carbon-black/>> [zuletzt abgerufen am 14. September 2014].
- Cesta, M. F., Ryman-Rasmussen, J. P., Wallace, D. G., Masinde, T., Hurlburt, G., Taylor, A. J., Bonner, J. C., 2010. Bacterial lipopolysaccharide enhances PDGF signaling and pulmonary fibrosis in rats exposed to carbon nanotubes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43:142-151.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Howie, S. E. M., Scotton, C. J., Wallace, W. A. H., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., Donaldson, K., 2011. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of  $Zn^{2+}$  dissolution inside lysosomes. *Part. Fibre Toxicol.* 8:27.
- Cho, W.-S., Duffin, R., Poland, C. A., Howie, S. E. M., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., Donaldson, K., 2010. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ. Health Perspect.* 118:1699-1706.
- Choi, H. S., Ashitate, Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Matsui, A., Insin, N., Bawendi, M. G., Semmler-Behnke, M., Frangioni, J. V., Tsuda, A., 2010. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat. Biotechnol.* 28:1300-1303.
- Chung, K. F., 2006. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets* 7:675-681.
- Corren, J., Togias, A., Bousquet, J., 2003. *Upper and Lower Respiratory disease*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Corti, M., Brody, A. R., Harrison, J. H., 1996. Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:309-315.
- Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E. R., 1982. Cell number and cell characteristics of normal human lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125:332-337.
- Crystal, R. G., Randell, S. H., Engelhardt, J. F., Voynow, J., Sunday, M. E., 2008. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5:772-7.

Dahl, A., Gharibi, A., Swietlicki, E. Gudmundsson, A., Bohgard, M., Ljungman, A., Blomqvist, G., Gustafsson, M., 2006. Traffic-generated emissions of ultrafine particles from pavement-tire interface. *Atmos. Environ.* 40:1314-1323.

DECHEMA e. V., o. J. *Industrieruß (Carbon Black) - Materialinfo*. [Online] Verfügbar unter: <<http://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/industrieruss/materialinfo-industrie-russ>> [zuletzt abgerufen am 1. Oktober 2014].

De Vooght, V., Vanoirbeek, J. A. J., Haenen, S., Verbeken, E., Nemery, B., Hoet, P. H. M., 2009. Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. *Toxicology* 259:84-89.

DGW, KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co, o. J. a. *Carbon Black, Was ist Carbon Black?* [Online] Verfügbar unter: <[http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index\[viewer\]\[page\]=products\\_carbon\\_black](http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index[viewer][page]=products_carbon_black)> [zuletzt abgerufen am 17. September 2014].

DGW, KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co, o. J. b. *Sicherheit* [Online] Verfügbar unter: <[http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index\[viewer\]\[page\]=guidelines\\_security](http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index[viewer][page]=guidelines_security)> [zuletzt abgerufen am 2. Oktober 2014].

Dhawan, A. & Sharma, V., 2010. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 398:589-605.

Diabaté, S., Bergfeldt, B., Plaumann, D., Ubel, C., Weiss, C., 2011. Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 401:3197-3212.

Dobbs, L. G. & Johnson, M. D., 2007. Alveolar epithelial transport in the adult lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 159:283-300.

Donaldson, K. & Seaton, A. 2012. A short history of the toxicology of inhaled particles *Part. Fibre Toxicol.* 9:13.

Donnet, J.-B., Bansal, R. C. und Wang, M.-J., 1993. *Carbon Black - Science and Technology*, Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.



- Driscoll, K. E., Costa, D. L., Hatch, G., Henderson, R., Oberdörster, G., Salem, H., Schlesinger, R. B., 2000. Intratracheal instillation an an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol. Sci.* 55:24-35.
- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., Marega, R., Wu, W., Bonifazi, D., Briand, J. P., Prato, M., Muller, S., Bianco, A., 2006. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 6:1522-1528.
- Dutta, D., Sundaram, S. K., Teeguarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., Addleman, S. R., Kaysen, G. A., Moudgil, B. M., Weber, T. J., 2007. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol. Sci.* 100:303-315.
- Ehrenberg, M. S., Friedman, A. E., Finkelstein, J. N., Oberdörster, G., McGrath, J. L., 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30:603-610.
- European Comission, Official Journal of the European Union, 2011. *Recommendations, Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial*. [pdf] Brüssel: European Comission. Verfügbar unter: <[http://ec.europa.eu/research/industrial\\_technologies/policy\\_en.html](http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/policy_en.html)> [zuletzt abgerufen am 14. September 2014].
- Fehrenbach, H. 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* 2:33-46.
- Fehrenbach, H., 2010. *Zelltyp- und -lungenregionsspezifische toxikologische Wirkung synthetischer Carbon Black Nanopartikel (CBNP) bei pulmonaler Exposition - Etablierung eines humanprädiktiven Prüfverfahrens*. Antrag zur BMBF NanoCare Ausschreibung. Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Bereich Experimentelle Pneumologie.
- Fehrenbach, H., 2014. *Teilprojekt 4 – Endbericht Carbon Black*. Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Bereich Experimentelle Pneumologie.

- Fiedeler, U. & Fries, R., 2011. *Messung und Charakterisierung von Nanopartikeln in der Luft*. [pdf] Wien: Institutionelles Repositorium der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Verfügbar unter: <<http://epub.oeaw.ac.at/?arp=0x0029f3d0>> [zuletzt abgerufen am 30. September 2014].
- Forman, H. J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* 22:189-216.
- Foster, W. M., Walters, D. M., Longphre, M., Macri, K., Miller, L. M., Methodology for the mouse by scintigraphy. *J. Appl. Physiol.* 90:1111-1118.
- Frampton, M. W., Utell, M. J., Zareba, W., Oberdörster, G., Cox, C., Huang, L. S., Morrow, P. E., Lee, F. E., Chalupa, D., Frasier, L. M., Speers, D. M., Stewart, J., 2004. Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 126:1-47.
- Garza, K. M., Soto, K. F., Murr, L. E., 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int. J. Nanomedicine* 3:83-94.
- Gehr, P., Green, F. H. Y., Geiser, M., Im Hof, V., Lee, M. M., Schürch, S., 1996. Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J. Aerosol Med.* 9:163-181.
- Gehr, P. & Heyder, J., 2005. *Particle-Lung Interactions*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Geiser, M., 2010. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug. Deliv.* 23:207-217.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., Gehr, P., 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 113:1555-1560.
- Gekle, M., 2010. *Taschenlehrbuch Physiologie*. Thieme: Stuttgart.
- Gibrellini, F. & Smith, T. K., 2010. The Kennedy Pathway-De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62: 414–428.

Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fabel, H., Alarie, Y., Renz, H., 2001. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280:L565-573.

Government of Canada, Environment Canada, 2013. *Screening Assessment for the Challenge. Carbon Black. Chemical Abstracts Service Registry Number 1333-86-4.* [Online] Verfügbar unter: <<http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=En&n=2cf34283-1>> [zuletzt abgerufen am 1. Oktober 2014].

Grenz-Echo AG, 2013. *Industrieunfall: Anwohner beklagen Informationsmangel auf allen Ebenen, Ruß wirbelt nach Wochen immer noch Staub auf.* [Online] Verfügbar unter: <<http://www.grenzecho.net/ArtikelLoad.aspx?aid=4fe8653e-20dc-44ef-89b4-644d8bb8f756>> [zuletzt abgerufen am 30. September 2014].

Gumbleton, M., 2001. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49:281–300.

Hamm, H., Kroegel, C., Hohlfeld, J., 1996. Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respir. Med.* 90:251-270.

Hansen, T., 2014. *Teilprojekt 2: Tox-Screening in vitro - Inhalation in vivo. Endbericht-Carbon Black.* Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin, Abteilung In-vitro-Toxikologie, Hannover.

Harkema, J. R., Carey, S. A., Wagner, J. G., 2006. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol. Pathol.* 34: 252-269.

He, C., Morawska, L., Taplin, L., 2007. Particle emission characteristics of office printers. *Environ. Sci. Technol.* 41:6039-6045.

Heldmaier, G. & Neuweiler, G., 2004. *Vegetative Physiologie.* Berlin: Springer.

Herzog, E., Byrne, H. J., Davoren, M., Casey, A., Duschl, A., Oostingh, G. J., 2009. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236:276-81.

Hildebrand, M. & Goslow, G., 2004. *Vergleichende und Funktionelle Anatomie der Wirbeltiere.* Berlin: Springer.

HLUG, Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie, 2014. *HLUG-Informationsblatt, Feinstaub (PM10), Eigenschaften - Quellen - gesundheitliche Bewertung - Immissionen*. [pdf] Wiesbaden: HLUG Hessen. Verfügbar unter: <<http://www.hlug.de/start/luft/luftschaedstoffe/pm10.html>> [zuletzt abgerufen am 30. September 2014].

Hodgson, J., Jones, R., 1985. A mortality study of carbon black workers employed at five United Kingdom factories between 1947 and 1980. *Arch. Environ. Health* 40:261-268.

Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., Koshland, C. P., 2012. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem. Res. Toxicol.* 25:1885-1892.

Huang, C. W., Pei, C., Huang, C. H., 2011. Respiratory deposition model of an inhaled aerosol bolus. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 14:915-925.

Hughes, L. S. & Cass, G. R., 1998. Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area. *Environ. Sci. Technol.* 32:1153-1161.

IARC/WHO, International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 1984. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 33, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 2: Carbon Blacks, Mineral Oils (Lubricant Base Oils and Derived Products) and Some Nitroarenes*. [pdf] Lyon: IARC/WHO. Verfügbar unter: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/index.php>> [zuletzt abgerufen am 14. Oktober 2014].

IARC/WHO, International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2010. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 93, Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc*. [pdf] Lyon: IARC/WHO. Verfügbar unter: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/>> [zuletzt abgerufen am 16. September 2014].

IARC/WHO, International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2012. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100F, Chemical Agents and Related Occupations*. [pdf] Lyon: IARC/WHO. Verfügbar unter: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/>> [zuletzt abgerufen am 14. Oktober 2014].

IARC/WHO, International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2013. *Press Release N° 221, Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths*. [pdf] Lyon: IARC/WHO. Verfügbar unter: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/news/news/2013/10/outdoor-air-pollution-a-leading-environmental-cause-of-cancer-deaths>> [zuletzt abgerufen am 16. September 2014].

ICBA, International Carbon Black Association, 2014a. *What is Carbon Black? General Information*. [Online] Verfügbar unter: <<http://www.carbon-black.org/index.php/what-is-carbon-black>> [zuletzt abgerufen am 14. September 2014].

ICBA, International Carbon Black Association, 2014b. *Environmental Aspects - What is Carbon Black?* [Online] Verfügbar unter: <<http://www.carbon-black.org/index.php/what-is-carbon-black/environmental-aspects>> [zuletzt abgerufen am 2. Oktober 2014].

Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Hirano, S., Sakurai, M., Shimada, A., Yoshikawa, T., 2006. Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice. *Environ. Health Perspect.* 114:1325-1330.

Inoue, K., Yanagisawa, R., Koike, E., Nakamura, R., Ichinose, T., Tasaka, S., Kiyono, M., Takano, H., 2011. Effects of carbon black nanoparticles on elastase-induced emphysematous lung injury in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108:234-240.

Jackson, P., Hougaard, K. S., Boisen, A. M., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Møller, P., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Andersen, O., Loft, S., Vogel, U., Wallin, H., 2012. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology.* 6:486-500.

Jacobsen, N. R., Møller, P., Jensen, K., Vogel, U., Ladefoged, O., Loft, S., Wallin, H., 2009. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Part. Fibre. Toxicol.* 6:2.

- Jacobsen, N. R., Pojana, G., White, P., Møller, P., Cohn, C. A., Korsholm, K. S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., Wallin, H., 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutat<sup>TM</sup> Mouse lung epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49:476-487.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanopart. Res.* 11:77-89.
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., Brentani, R. R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11:447-455.
- Kamata, H., Tasaka, S., Inoue, K., Miyamoto, K., Nakano, Y., Shinoda, H., Kimizuka, Y., Fujiwara, H., Ishii, M., Hasegawa, N., Takamiya, R., Fujishima, S., Takano, H., Ishizaka, A., 2011. Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. *Exp. Biol. Med.(Maywood)* 236:315-324.
- Kamimura, D., Ishihara, K., Hirano, T., 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149:1-38.
- Kaur, S., Senthilkumar, K., Verma, V. K., Kumar, B., Kumar, S., Katnoria, J. K., Sharma, C. S., 2013. Preliminary analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in air particles (PM10) in Amritsar, India: sources, apportionment, and possible risk implications to humans. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65:382-395.
- Kendall, M., Brown, L., Trought, K., 2004. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal. Toxicol.* 16:99-105.
- Kendall, M., Ding, P., Mackay, R.-M., Deb, R., McKenzie, Z., Kendall, K., Madsen, J., Clark, H., 2013. Surfactant protein D (SP-D) alters cellular uptake of particles and nanoparticles. *Nanotoxicology* 7:963-973.
- Kennedy, E. P. & Weiss, S. B., 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J. Biol. Chem.* 222:193-214.

- Khandoga, A., Stoeger, T., Khandoga, A. G., Bihari, P., Karg, E., Ettehadieh, D., Lakatos, S., Fent, J., Schulz, H., Krombach, F., 2010. Platelet adhesion and fibrinogen deposition in murine microvessels upon inhalation of nanosized carbon particles. *J. Thromb. Haemost.* 8:1632-1640.
- Kinnula V. L. & Crapo, J. D., 2003. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:1600-1619.
- Klose, W., Köchling, K.-H., Vogler, C., Voll, R. und Wolf, R., 2009. *Terminologie zur Beschreibung von Kohlenstoff als Feststoff*. Kassel: kassel university press GmbH.
- König, P., 2014. *Teilprojekt 3: Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln auf das Trachealepithel. Endbericht Carbon Black*. Universität zu Lübeck, Institut für Anatomie.
- Kolling, A., Ernst, H., Rittinghausen, S., Heinrich, U., 2011. Relationship of pulmonary toxicity and carcinogenicity of fine and ultrafine granular dusts in a rat bioassay. *Inhal. Toxicol.* 23:544-554.
- Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Möller, W., 2013. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc. Chem. Res.* 46:714-722.
- Kreyling, W. G. & Geiser, M., 2009. *Dosimetry of Inhaled Nanoparticles. Nanoparticles in Medicine and Environment, Inhalation and Health Effects*. Berlin: Springer.
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch. Toxicol.* 86:1123-1136.
- Krug, H. F., 2014. Nanosicherheitsforschung - sind wir auf dem richtigen Weg? *Angew. Chem.* 126:2-19.
- Kulkarni, P., Baron, P. A., Willeke, K., 2011. *Aerosol Measurement - Principles, Techniques, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc..

- Kyjevská, Z. O., Jacobsen, N. R., Saber, A. T., Bengtson, S., Jackson, P., Wallin, H., Vogel, U., 2014. DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice. *Environ. Mol. Mutagen* Epub ahead of print.
- Lakatos, H. F., Burgess, H. A., Thatcher, T. H., Redonnet, M. R., Hernady, E., Williams, J. P., Sime, P. J., 2006. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp. Lung Res.* 32:181-199.
- LANUV NRW, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, 2014. *Jahreskenngrößen und Jahresberichte*. [Online] Verfügbar unter: <[http://www.lanuv.nrw.de/luft/immissionen/ber\\_trend/kenn.htm](http://www.lanuv.nrw.de/luft/immissionen/ber_trend/kenn.htm)> [zuletzt abgerufen am 2. Oktober 2014].
- Lee, B.-K. & Vu, V. T., 2010. Sources, *Distribution and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Particulate Matter*. In: *Air Pollution Sources*, Shanghai: InTech.
- Levy, L. S., Chaudhuri, I. S., Krueger, N., McCunney, R. J., 2012. Does carbon black disaggregate in lung fluid? A critical assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 25:2001-6.
- Levy, L. S., Chaudhuri, I. S., Morfeld, P., McCunney, R. J., 2011. Comments on induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *J. Biol. Chem.* 286:1e17.
- Li, Z. & Vance, D. E., 2008. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J. Lipid Res.* 49:1187-1194.
- Liebich, H. G. & Budras, K. D., 2010. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. Stuttgart: Schattauer.
- Lim, C.-H., Kang, M., Han, J.-H., Yang, J.-S., 2012. Effect of agglomeration on the toxicity of nano-sized carbon black in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Toxicol.* 27: e2012015.



- Liu, Z., Dong, X., Song, L., Zhang, H., Liu, L., Zhu, D., Song, C., Leng, X., 2013. Carboxylation of multi-walled carbon nanotube enhanced its biocompatibility with L02 cells through decreased activation of mitochondrial apoptotic pathway. *J. Biomed. Mater. Res.* 102:665-673.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 25:402-408.
- Livraghi, A. & Randell, S. H., 2007. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicol. Pathol.* (2007); 35:116-129.
- Long, C. M., Nascarella, M. A., Valberg, P. A., 2013. Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: physical and chemical distinctions. *Environ. Pollut.* 181:271-286.
- Lourenco, R. V. & Cotromanes, E., 1982. Clinical aerosols. I. Characterization of aerosols and their diagnostic uses. *Arch. Intern. Med.* 142:2163-2172.
- Macklin, C. C., 1954. The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet* 266:1099-1104.
- Mangum, J. B., Turpin, E. A., Antao-Menezes, A., Cesta, M. F., Bermudez, E., Bonner, J. C., 2006. Single-Walled Carbon Nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages *In Situ. Part. Fibre. Toxicol.* 3:15.
- Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., Boland, S., 2011. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch. Toxicol.* 85:733-741.
- Markert, C. L., 1984. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem. Funct.* 2:131-134.
- Mason, R. J., 2006. Biology of alveolar type II cells. *Respirology* 11:S12–S15.
- Mason, R. J. & Williams, M. C., 1977. Type II alveolar cell: defender of the alveolus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115:81–91.

- Mestas, J. & Hughes, C. C., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172:2731-2738.
- Möller, W., Brown, D. M., Kreyling, W. G., Stone, V., 2005. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part. Fibre Toxicol.* 2:7.
- Nassimi, M., Schleh, C., Lauenstein, H. D., Hussein, R., Hoymann, H. G., Koch, W., Pohlmann, G., Krug, N., Sewald, K., Rittinghausen, S., Braun, A., Müller-Goymann, C., 2010. A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75:107-116.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Lommatzsch, M., Herz, U., Kips, J., Alarie, Y., Renz, H., 2000. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121:57-67.
- Nicholas, T. E., 1993. Control of turnover of alveolar surfactant. *News Physiol. Sci.* 8:12-18.
- Nicholas, T. E., 1996. Pulmonary surfactant: no mere paint on the alveolar wall. *Respirology* 1:247-257.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., 1999. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Eingeweide*. Berlin: Parey.
- Nicod, L. P., 1999. Pulmonary defence mechanisms. *Respiration* 66:2-11.
- Niwa, Y., Hiura, Y., Sawamura, H., Iwai, N., 2008. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats. *Circ. J.* 72:144-149.
- Nygaard, U. C., Hansen, J. S., Samuelson, M., Alberg, T., Marioara, C. D., Løvik, M., 2009. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol. Sci.* 109:113-123.

- Nygaard, U. C., Samuelsen, M., Marioara, C. D., Løvik, M., 2013. Carbon nanofibers have IgE adjuvant capacity but are less potent than nanotubes in promoting allergic airway responses. *Biomed. Res. Int.* 2013:476010.
- Oberdörster, G., 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74:1-8.
- Oberdörster, G., Elder, A., Rinderknecht, A., 2009. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9:4996-5007.
- Ochs, M., Nyengaard, J. R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J., Gundersen, H. J., 2004. The number of alveoli in the human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169:120-4.
- Orion Engineered Carbons GmbH, 2013a. *Manufacturing Processes*. [Online] Verfügbar unter: <<http://www.orioncarbons.com/technologies>> [zuletzt abgerufen am 1. Oktober 2014].
- Orion Engineered Carbons GmbH, 2013b. *Overview of major Carbon Black Applications*. [Online] Verfügbar unter: <[http://www.orioncarbons.com/applications\\_\\_](http://www.orioncarbons.com/applications__)> [zuletzt abgerufen am 1. Oktober 2014].
- Osier, M. & Oberdörster, G., 1997. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: Differences in particle effects. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40:220-227.
- Pakkanen, T. A., Kerminen, V.-M., Korhonen, C. H., Hillamo, R. E., Aarnio, P., Koskentalo, T., Maenhaut, W., 2001. Urban and rural ultrafine (PM<sub>0.1</sub>) particles in the Helsinki area. *Atmos. Environ.* 35:4593-4607.
- Puchelle, E., Girod-de Bentzmann, S., Jacquot, J., 1992. Airway defence mechanisms in relation to biochemical and physical properties of mucus. *Eur. Respir. Rev.* 2:259-263.
- Pyrolyx AG, o. J. *Carbon Black, Weltmarkt und Chancen*. [Online] Verfügbar unter: <<http://pyrolyx.com/carbon-black/>> [zuletzt abgerufen am 17. September 2014].
- Quinlan, T., Spivack, S., Mossman, B. T., 1994. Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ. Health Perspect.* 102:79-87.

- Rao, G. V., Tinkle, S., Weissman, D. N., Antonini, J. M., Kashon, M. L., Salmen, R., Battelli, L. A., Willard, P. A., Hoover, M. D., Hubbs, A. F. 2003. Efficacy of a technique for exposing the mouse lung to particles aspirated from the pharynx. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66:1441-1452.
- Renwick, L. C., Brown, D., Clouter A., Donaldson, K., 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 61:442-447.
- Reynaert, N. L., 2011. Glutathione biochemistry in asthma. *Biochim. Biophys. Acta* 1810:1045-1051.
- Reynolds, H. Y., 1987. Host defense impairments that may lead to respiratory infections. *Clin. Chest. Med.* 8:339-58.
- Rogula-Kozłowska, W., Kozielska, B., Błaszczak, B., Klejnowski, K., 2012. 7. *The mass distribution of particle-bound PAH among aerosol fractions: a case-study of an urban area in Poland. In: Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention -Environmental and Analytical Update.* Shanghai: InTech.
- Rose, M. C. & Voynow, J. A., 2006. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* 86:245-278.
- Roulet, A., Armand, L., Dagouassat, M., Rogerieux, F., Simon-Deckers, A., Belade, E., Van Nhieu, J. T., Lanone, S., Pairon, J. C., Lacroix, G., Boczkowski, J., 2012. Intratracheally administered titanium dioxide or carbon black nanoparticles do not aggravate elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *BMC Pulm. Med.* 12:38.
- Roursgaard, M., Jensen, K. A., Poulsen, S. S., Jensen, N. E., Poulsen, L. K., Hammer, M., Nielsen, G. D, Larsen, S. T., 2011. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *Sci. World J.* 11:801-825.
- Rouse, R. L., Murphy, G., Boudreaux, M. J., Paulsen, D. B., Penn, A. L., 2008. Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress, and inflammation in murine lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39:198-207.

- Ruenraroengsak, P., Novak, P., Berhanu, D., Thorley, A. J., Valsami-Jones, E., Gorelik, J., Korchev, Y. E., Tetley, T. D., 2012. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology* 6:94-108.
- Ruge, C. A., Kirch, J., Cañadas, O., Schneider, M., Perez-Gil, J., Schaefer, U. F., Casals, C., Lehr, C.-M., 2011. Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomed.-Nanotechnol.* 7:690-693.
- Saber, A. T., Jensen, K. A., Jacobsen, N. R., Birkedal, R., Mikkelsen, L., Møller, P., Loft, S., Wallin, H., Vogel, U., 2012. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology*. 6:453-471.
- Saber, A. T., Lamson, J. S., Jacobsen, N. R., Ravn-Haren, G., Hougaard, K. S., Nyendi, A. N., Wahlberg, P., Madsen, A. M., Jackson, P., Wallin, H., Vogel, U., 2013. Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk. *PLoS One*. 8:e69020.
- Salvador-Morales, C., Townsend, P., Flahaut, E., Vénien-Bryan, C., Vlandes, A., Green, M. L. H., Sim, R. B., 2007. Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon* 45:607-617.
- Saputra, D., Yoon, J. H., Park, H., Heo, Y., Yang, H., Lee, E. J., Lee, S., Song, C. W., Lee, K., 2014. Inhalation of carbon black nanoparticles aggravates pulmonary inflammation in mice. *Toxicol. Res.* 30:83-90.
- Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J. M., Moore, V. C., Doyle, C. D., West, J. L., Billups, W. E., Ausman, K. D., Colvin, V. L., 2006. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol. Lett.* 161:135-142.
- Scheuch, G., Stahlhofen, W., Heyder, J., 1996. An approach to deposition and clearance measurements in human airways. *J. Aer. Med.* 9:35-41.
- Schinwald, A., Murphy, F. A., Jones, A., MacNee, W., Donaldson, K., 2012. Graphene-based nanoplatelets: a new risk to the respiratory system as a consequence of their unusual aerodynamic properties. *ACS Nano*. 6:736-746.

- Scholzen, T. & Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182:311-322.
- Schreider, J. P. & Raabe, O. G., 1981. Structure of the human respiratory acinus. *Am. J. Anat.* 162:221-32.
- Shimada, A., Kawamura, N., Okajima, M., Kaewamatawong, T., Inoue, H., Morita, T., 2006. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol. Pathol.* 34:949-957.
- Sibille, Y. & Reynolds, H. Y., 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:471-501.
- Simkó, M., Nentwich, M., Gázsó, A., Fiedeler, U., 2008. *Wie kommen Nanopartikel in den menschlichen Körper und was verursachen sie dort?* [pdf] Wien: Institutionelles Repositorium der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Verfügbar unter: <<http://epub.oeaw.ac.at/?arp=0x001a2436>> [zuletzt abgerufen am 30. September 2014].
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Snipes, M. B., 1989. Long-term retention and clearance of particles inhaled by mammalian species. *Crit. Rev. Toxicol.* 20:175-211.
- Soares, M. C. F., Viana, M. M., Schaefer, Z. L., Gangoli, V. S., Cheng, Y., Caliman, V., Wong, M. S., Silva, G. G., 2014. Surface modification of carbon black nanoparticles by dodecylamine: thermal stability and phase transfer in brine medium. *Carbon* 72:287-295.
- Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroepel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J., Schulz, H., 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ. Health Perspect.* 114:328-333.
- Stone, K. C., Mercer, R. R., Gehr, P., Stockstill, B., Crapo, J. D., 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6:235-243.

- Stone, V., Johnston, H., Schins, R. P. F., 2009. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit. Rev. Toxicol.* 39: 613-626.
- Stuart, B. O., 1984. Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ. Health Perspect.* 55:369-390.
- Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R. P. F., Unfried, K., 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291: L725-L733.
- Tena, A. F. & Clarà, P. C., 2012. Deposition of inhaled particles in the lung. *Arch. Bronconeumol.* 48:240-246.
- Tötsch, M., Guzman, J., Theegarten, D., Schmid, K. W., Costabel, U., 2007. [Bronchoalveolar lavage]. *Pathologe* 28:346-353.
- Treunitz, P. M. & Dintzis, S. M., 2012. *Comparative Anatomy and Histology - A Mouse and Human Atlas*. 1<sup>st</sup> Edition, Amsterdam: Elsevier.
- Van As, A. & Webster, I., 1972. The organization of ciliary activity and mucus transport in pulmonary airways. *S. Afr. Med. J.* 46:347-350.
- Van Golde, L. M. G., 1995. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol. Neonate* 67:2-17.
- Verma, N. K., 2013. *Physics for engineers*. New Delhi: Prentice-Hall Of India.
- Verra, F., Escudier, E. Lebargy, F., Bernaudin, J. F., De Crémoux, H., Bignon, J., 1995. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:630-4.
- Von Neergaard, K., 1929. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Reaktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z. Ges. Exp. Med.* 66:373-394.

- Wallace, W. E., Keane, M. J., Mike, P. S., Hill, C. A., Vallyathan, V., Regad, E. D., 1992. Contrasting respirable quartz and kaolin retention of lecithin surfactant and expression of membranolytic activity following phospholipase A2 digestion. *J. Toxicol. Environ. Health* 37:391-409.
- Wang, M. J., Gray, C. A., Reznick, S. A., Mahmud, K. und Kutsovsky, Y., 2003. *Carbon Black*. In: *Kirk-othmer encyclopedia of chemical toxicology*. Volume 4. New York: John Wiley & Sons.
- Wang, L., Mercer, R. R., Rojanasakul, Y., Qiu, A., Lu, Y., Scabilloni, J. F., Wu, N., Castranova, V., 2010. Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73:410-422.
- Watson, A. Y. & Valberg, P. A., 2001. Carbon black and soot: two different substances. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 62: 218-228.
- Weinhold, K. & König, P., 2012. Nanoparticles increase ciliary beat frequency in the murine trachea *Pneumologie* 66-A805.
- Wellmann, J., Weiland, S. K., Neiteler, G., Klein, G., Straif, K., 2006. Cancer mortality in German carbon black workers 1976–98. *Occup. Environ. Med.* 63:513-521.
- Welsch, U., 2006. *Sobotta Lehrbuch der Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. 2. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier.
- West, J. B. 2009. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297:R1625-34.
- WHO, World Health Organization, 2014. *7 million premature deaths annually linked to air pollution*. [Online] Verfügbar unter: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/>> [zuletzt abgerufen am 17. September 2014].
- Widdicombe, J. G., 1995. Neurophysiology of the cough reflex. *Eur. Respir. J.* 8:1193-1202.
- Wolf, B. B. & Green, D. R., 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274:20049-20052.



Wright, J. R., 1997. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol. Rev.* 77:931-962.

Wright, J. R., Dobbs, L. G., 1991. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu. Rev. Physiol.* 53:395-414.

Wright, J. R. & Hawgood, S., 1989. Pulmonary surfactant metabolism. *Clin. Chest. Med.* 10:83-93.

Yeates, D. B., Gerrity, T. R., Garrard, C. S., 1981. Particle deposition and clearance in the bronchial tree. *Ann. Biomed. Eng.* 9:577-92.

Zaciera M., Kurek, J., Dzwonek, L., Feist, B., Jedrzejczak, A., 2012. Seasonal variability of PAHs and nitro-PAHs concentrations in total suspended particulate matter in ambient air of cities of silesian voivodeship. *Environ. Prot. Eng.* 38:45-50.

## 10. Abkürzungsverzeichnis

|          |  |
|----------|--|
| A        | Alveole  |
| Abb.     | Abbildung  |
| AK       | Antikörper   |
| B        | Bronchiolus  |
| BAAQMD   | engl. Bay Area Air Quality Management District                     |
| BAL      | Bronchoalveoläre Lavage  |
| BALB/c   | Mausstamm  |
| BaP      | Benzo[a]pyren  |
| BCA      | Bicinchonininsäure   |
| BCIP/NBT | 5-Bromo-4chloro-3inodyl-phosphat und Nitroblautetrazolium          |
| BET      | Bestimmung der Partikeloberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller |
| BG       | Blutgefäß  |
| BMU      | Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit   |
| BSA      | engl. bovine serum albumin   |
| BUND     | Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland                        |
| CBA      | engl. cytometric bead array  |
| CBNP     | engl. carbon black nanoparticle                                    |
| CCCL2    | engl. chemokine (C-C motif) ligand 2                               |
| cDNA     | engl. complementary deoxyribonucleic acid                          |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| CK $\alpha$ und $\beta$ | Cholinkinase alpha und beta                     |
| CNT                     | engl. carbon nanotube                           |
| CRP                     | C-reaktives Protein                             |
| CTP $\alpha$            | Cholinphosphatcytidyl-Transferase alpha         |
| CXXL-1                  | Signalstoff, Sortierung lysosomaler Proteine    |
| C5a                     | Komplementkomponente C5                         |
| C57BL/6                 | Mausstamm                                       |
| d                       | engl. day                                       |
| D                       | Deutschland                                     |
| DA                      | Ductus alveolaris                               |
| DGW                     | KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co               |
| DMEM                    | Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium              |
| DNA                     | engl. deoxyribonucleic acid                     |
| DPPC                    | Dipalmitoylphosphatidylcholin                   |
| DQ12                    | Dörentrapper Quarz, Referenzpartikel            |
| DTT                     | Dithiotreithol                                  |
| E                       | Eosiner Granulozyt                              |
| EDTA                    | Ethylendiamintetraessigsäure                    |
| EF50                    | Expiratorischer Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen |
| ELISA                   | engl. enzyme linked immunosorbent assay         |
| engl.                   | englisch  |
| ER                      | Erythrozyt                                      |
| et al.                  | lat., und andere                                |

|         |   |
|---------|---|
| EU      | Europäische Union                                 |
| FCS     | engl. fetal calf serum                            |
| g       | Gravitation/x-faches der Erdbeschleunigung        |
| GD      | Gestationstag                                     |
| GPX     | Glutathionperoxidase                              |
| GR      | Glutathionreduktase                               |
| griech. | griechisch  |
| h       | engl. hour  |
| H. E.   | Hämatoxylin-Eosin Färbung                         |
| HEPA    | engl. high-efficiency particulate air (Filter)    |
| HF      | Hochfrequenz                                      |
| HLUG    | Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie      |
| i. p.   | intraperitoneal                                   |
| i. I.   | intratracheale Instillation                       |
| IARC    | engl. International Agency for Research on Cancer |
| ICAM-1  | interzelluläres Adhäsionsmolekül-1                |
| ICBA    | engl. International Carbon Black Association      |
| Ig      | Immunglobulin                                     |
| IHC-P   | Immunohistochemie (Paraffin)                      |
| IL      | Interleukin                                       |
| KAT     | Katalase  |
| KC      | engl. keratinocyte-derived cytokine               |
| Ki-67   | Protein, Marker für Zellteilung                   |

|           |  |
|-----------|--|
| KIT       | Karlsruher Institut für Technologie                                      |
| LANUV NRW | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz<br>Nordrhein-Westfalen |
| LDH       | Lactat-Dehydrogenase   |
| LPS       | Lipopolysaccharid  |
| Lsg.      | Lösung   |
| L32       | Ribosomales Protein L32  |
| M         | Makrophage   |
| MCC       | engl. mucociliar clearance   |
| MCh       | Acetyl- $\beta$ -methylcholinchlorid                                     |
| MCP-1     | engl. monocyte chemoattractant protein-1                                 |
| MIP       | engl. macrophage inflammatory protein                                    |
| miR-135b  | micro RNA-135b   |
| mRNA      | engl. messenger ribonucleic acid   |
| MWCNT     | engl. multi-walled carbon nanotube                                       |
| N         | Neutrophiler Granulozyt  |
| NA        | 9-Nitroanthracen   |
| ND        | nicht durchgeführt   |
| NP        | Nanopartikel   |
| o. A.     | oropharyngeale Aspiration  |
| o. J.     | ohne Jahresangabe  |
| OD        | optische Dichte  |
| OVA       | Ovalbumin  |

|          |   |
|----------|---|
| p        | p-Wert der statistischen Tests  |
| PAKs     | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe                                    |
| PAS      | Perjodsäure-Schiff-Reagenz  |
| PBS      | engl. phosphate buffered saline   |
| PCLS     | engl. precision-cut lung slices   |
| PCR      | engl. polymerase chain reaction   |
| pH       | lat. pondus hydrogenii  |
| PM       | engl. particulate matter  |
| PMN      | polymorphonukleär   |
| Pr90     | Printex®90  |
| qRT-PCR  | engl. quantitative real-time reverse transcriptase<br>polymerase chain reaction |
| REM      | Rasterelektronenmikroskop   |
| ROS      | reaktive Sauerstoffspezies  |
| RT       | Raumtemperatur  |
| Saa3     | Serum Amyloid A3 Apolipoprotein   |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyarylamid-Gelelektrophorese                              |
| SEM      | engl. standard error of the mean  |
| SOD      | Superoxiddismutase  |
| SP       | Surfactant Protein  |
| SWCNT    | engl. single-walled carbon nanotube   |
| Tab.     | Tabelle   |
| TEER     | engl. trans epithelial electric resistance                                      |

|                  |  |
|------------------|--|
| TEMED            | Tetramethylethylenediamin                            |
| TGF- $\beta$ 1   | engl. transforming growth factor beta 1              |
| TiO <sub>2</sub> | Titandioxid  |
| TNF $\alpha$     | Tumor Nekrose Faktor alpha                           |
| Tris             | Trishydroxymethylaminomethan                         |
| UV               | Ultraviolettstrahlung                                |
| V.               | Verdünnung   |
| vs.              | versus   |
| WHO              | engl. World Health Organisation                      |
| wk               | engl. week   |
| WST-1            | engl. water soluble tetrazolium, Zellviabilitätstest |

Die Verwendung von Zeichen normierter Maß-, Längen- und Zeiteinheiten, sowie die Abkürzungen chemischer Verbindungen erfolgten laut aktuell gültiger deutscher Rechtschreibung bzw. den allgemein gültigen Regeln der chemischen Nomenklatur.

# ANHANG

## I Übersicht der verwendeten Materialien

### I. I Reagenzien

| <b>Chemikalien</b>                                | <b>Hersteller/Vertrieb</b>                    |
|---|---|
| Acetyl- $\beta$ -methylcholinchlorid (Metacholin) | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| Ammoniumheptamolybdattetrahydrat                  | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Aquatex   | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Bromophenolblau                                   | SERVA, Heidelberg, D                          |
| Chloroform  | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Complete <sup>™</sup> Protease Inhibitor          | Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, D            |
| Deconex <sup>®</sup>                              | Borer Chemie AG, Zuchwil, CH                  |
| DEPC-behandeltes Wasser                           | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D               |
| D(+)-Glucose Monohydrat                           | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Dispase <sup>®</sup> I (neutral protease grade`I) | Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, D            |
| DMEM Low Glucose<br>(1g/L; ohne L-Glutamin)       | PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU           |
| DNase1  | Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, D            |
| Dulbecco`s PBS<br>(1x/10x; ohne Ca & Mg)          | PAA-The cell culture company,<br>Pasching, AU |
| EDTA  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| Entellan <sup>®</sup>                             | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |



|   |   |
|---|---|
| Essigsäure  | Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze, D       |
| Ethanol, absolut  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| Ethanol, absolut, vergällt                                      | Otto Fischar GmbH & Co. KG,<br>Saarbrücken, D |
| Evans Blue  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| FCS   | PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU           |
| Formaldehyd-Lösung (3,5 - 3,7 %)                                | Otto Fischar GmbH & Co. KG,<br>Saarbrücken, D |
| Glyzerin  | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Glyzin  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D         |
| Guanidinhydrochlorid  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| Hepes Puffer-Lösung (1 M)                                       | PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU           |
| Isol-RNA Lysisreagenz   | 5 PRIME GmbH, Hamburg, D                      |
| L-Glutamin  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| LowCross Buffer <sup>®</sup>                                    | CANDOR, Bioscience GmbH, Wangen, D            |
| Low Melt Agarose  | FMC <sup>®</sup> BioProducts, Rockland, USA   |
| 2-Mercaptoethanol   | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D     |
| Methanol  | Fisher Scientific GmbH, Nidderau, D           |
| Microscopy, Giemsa's Azure-Eosin-Methylenblau-Lösung            | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| Microscopy, May-Grünwalds Eosin-Methylenblau-Lösung modifiziert | Merck KGaA, Darmstadt, D                      |
| NaCl-Lösung (0,9 %, isoton)                                     | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D           |

|  |   |
|--|---|
| Natriumdodecylsulfat   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Natriumhydroxid (1 M)  | Fisher Chemical, Loughborough, UK                               |
| Papanicolaous Lösung 1a Harris`<br>Hämatoxylin-Lösung                    | Merck KGaA, Darmstadt, D  |
| Perjodsäure  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Picrosirius Red Lösung, 0,1 % (Puchler)                                  | Waldeck, Münster, D   |
| 2-Propanol (Isopropylalkohol)  | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D                       |
| Reducer (Fiske-Subbarow)   | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D                       |
| Referenzlösungen für das pH-Messgerät<br>(pH 4,01; 6,87 und 9,18; 25 °C) | SCHOTT <sup>®</sup> Instruments, Otto E. Kober KG<br>Marburg, D |
| Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1)                                 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Salzsäure (37 %)   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Schiff's Reagenz für die Mikroskopie                                     | Merck KGaA, Darmstadt, D  |
| Schwefelsäure (95 - 97 %)  | Merck KGaA, Darmstadt, D  |
| Shandon Eosin Y  | Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D                           |
| Stripping Buffer   | CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, D                               |
| TEMED  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Trichloressigsäure (20 %)  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat   | Sigma Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D                       |
| TRIS-Hydrochlorid  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D                           |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan   | Acros, Organics N.V., Geel, B                                   |
| Trypan Blau Lösung (0,4 %)   | Invitrogen <sup>™</sup> , New York City, USA                    |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Tween20 <sup>®</sup>               | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D                                     |
| VOGEL-Histo Comp Einbettungsmedium | Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, D                                      |
| Wasser für Injektionszwecke        | Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D                                  |
| Wasserstoffperoxid                 | Rotipuran <sup>®</sup> von ROTH Carl Roth +<br>Co. KG, Karlsruhe, D |
| Xylol                              | Fisher Scientific GmbH, Nidderau, D                                 |

## I. II Arznei- & Betäubungsmittel

| Produktname                                   | Hersteller/Vertrieb                 |
|---|-------------------------------------|
| Heparin-Natrium-25000-ratiopharm <sup>®</sup> | Ratiopharm GmbH, Ulm, D             |
| Isofluran                                     | Baxter AG, München, D               |
| Narcoren <sup>®</sup> (Natrium-Pentobarbital) | Merial GmbH, Hallbergmoos, D        |
| Penicillin/Streptomycin (100 x)               | PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU |

## I. III Geräte

| Geräte                     | Hersteller/Vertrieb  |
|----------------------------|--|
| Analysenwaage              | Scaltec SBC 21, Sartorius AG, Goettingen, D  |
| Autotechnikon              | Sakura <sup>®</sup> Tissue-TEK <sup>®</sup> VIP E300, Sakura Finetek<br>Germany GmbH, Staufen, D |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator | CYTOPERM <sup>®</sup> 2, Heraeus Holding GmbH,<br>Hanau, D                                       |
| Deckgläschen (18x18 mm)    | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D   |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Easypet <sup>®</sup>               | Eppendorf AG, Hamburg, D  |
| Elektrophoresekommer               | AGS-Angewandte Gentechnologie Systeme<br>GmbH, Heidelberg, D  |
| Elektrophorese Power Supply        | Pharmacia ECPS 3000/150, Labexchange – Die<br>Laborgerätebörse GmbH, Burladingen, D   |
| Eppendorf Tubes                    | Eppendorf AG, Hamburg, D  |
| Gaze                               | Mesh opening 20 µm, Otto E. Kobe KG,<br>Marburg, D  |
| Glaswaren                          | SCHOTT AG, Mainz, D   |
| Handschuhe, NOBAGLOVE <sup>®</sup> | NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co KG,<br>Wetter, D  |
| Head-out Bodyplethysmograph        | Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH,<br>March-Hugstetten, D  |
| Heizblöcke                         | Rotilabo <sup>®</sup> -Block-Heater H 250, Carl Roth GmbH +<br>Co. KG, Karlsruhe; Gebr. Liebisch Type 2084,<br>Bielefeld, D |
| Käfige                             | Ehret GmbH, Emmendingen, D  |
| Kanülen/Kanülen (steril)           | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D<br>Microlance <sup>™</sup> , BD, Heidelberg, D  |
| Kühl- & Tiefkühlschränke           | Liebherr-Elektronik GmbH, Lindau, D<br>Heraeus Holding GmbH, Hanau, D   |
| Küvetten (10x10x45 mm)             | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D   |
| Laborstativ                        | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D   |
| Magnetrührer                       | Heidolph MR 2002, VWR International GmbH,<br>Darmstadt, D   |

|   |  |
|---|--|
| Membran (0,45 µm)                           | Immobilon-P Transfer Membrane, Merck KGaA, Darmstadt, D  |
| Mikroskop und Kamera                        | Leica DM RB and Leica DFC320, Leica Microsystems Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, D                                  |
| Mikrotiterplatten                           | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Mikrotiterplatten-Photometer                | Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D  |
| Mikrotom/Mikrotomklingen                    | Leica SM2000 R, Leica Microsystems Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Leica H/1210, Wetzlar, D; Feather A35, FEATHER, Osaka, JP |
| Mikrowelle                                  | AEG, Micromat Duo, Frankfurt am Main, D  |
| Mullbinde                                   | Paul Hartmann AG, Heidenheim, D  |
| NanoDrop 1000                               | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D  |
| Neubauerzählkammer(0,100 mm)                | Otto E. Kobe KG, Marburg, D  |
| NOBATEX <sup>®</sup> , elastische Mullbinde | NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co KG, Wetter, D  |
| Objektträger                                | Microscope and SuperFrost <sup>®</sup> slides, Gerhard-Menzel GmbH, Braunschweig, D  |
| PCR Tubes (0,1 ml)                          | LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, D  |
| PERFUSOR <sup>®</sup> Spritzen              | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D  |
| pH-Meter                                    | SCHOTT <sup>®</sup> Instruments, Lab 850, Otto E. Kobe KG, Marburg, D  |
| Photometer                                  | Hitachi U3200 Spectrophotometer, Scientific-Instruments, Schwäbisch Gmünd, D   |

|   |  |
|---|--|
| Pipetten                                      | Research <sup>®</sup> plus, Eppendorf AG, Hamburg, D                                     |
| Plattenreader                                 | FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH,<br>Ortenberg, D                                       |
| Rotor-Gene Q                                  | Qiagen GmbH, Hilden, D   |
| Schüttler                                     | Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D   |
| SEFAR NITEX <sup>®</sup>                      | Mesh opening 150 µm, Sefar AG, Heiden, CH  |
| Semi-Dry Transfer Unit                        | TE 77XP, SERVA Electrophoresis GmbH,<br>Heidelberg, D                                    |
| Sezierbesteck                                 | Aesculap AG, Tuttlingen, D   |
| Spitzen/Filterspitzen                         | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D  |
| Spritzen (1 ml)                               | BD, Heidelberg, D  |
| Stativclips                                   | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D  |
| Tischzentrifuge                               | Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory<br>Products GmbH, Langenselbold, D             |
| Tissue embedding center                       | Sakura <sup>®</sup> Tissue-TEK <sup>®</sup> , Sakura Finetek Germany<br>GmbH, Staufen, D |
| Ultrapure water system arium <sup>®</sup> 611 | Sartorius AG, Goettingen, D  |
| Ultraschallbad                                | BANDELIN SONOREX RK 102 P, BANDELIN<br>electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D               |
| Vortexer                                      | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,<br>REAX2000, Schwabach, D                            |
| Waage   | Kern 440-47N, KERN & SOHN GmbH,<br>Balingen, D   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Wasserbäder           | Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, D<br>Leica H/1210, Leica Mikrosysteme Vertrieb<br>GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, D                   |
| Werkbank Laminar Flow | Heraeus LaminAir <sup>®</sup> , HLB 2448, Heraeus Holding<br>GmbH, Hanau, GER and NuAire Laminar Flow<br>Products, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D |
| Zentrifuge            | Sepatech Varifuge 3.2RS, Heraeus Holding GmbH,<br>Hanau, D   |
| Zentrifugentubes      | Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, D  |
| Zytoclips             | Thermo Fisher Scientific GbH, Ulm, D   |
| Zytospinfilterkarten  | ALBET LabScience, Dassel, D  |
| Zytospinprobenkammer  | Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D  |
| Zytospinzentrifuge    | Shandon Cytospin2, LABEQUIP LTD., CA   |

## II Veröffentlichungen und Präsentationen

### Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Schreiber, N.**, Stroebele, M., Kopf, J., Hochscheid, R., Kotte, E., Weber, P., Hansen, T., Bockhorn, H., Mueller, B., 2013. Lung alterations following single or multiple low-dose Carbon Black Nanoparticle aspirations in mice. *J. Toxicol. Environ. Health A* 76:1317-1332.

### Weitere Veröffentlichungen:

Hochscheid, R., **Schreiber, N.**, Kotte, E., Weber, P., Cassel, W., Yang, H., Zhang, Y., Pöschl, U., Mueller, B., 2014. Nitration of protein without allergenic potential triggers modulation of antioxidant response in type II pneumocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 77:679-695.

### Teile dieser Arbeit wurden präsentiert als:

#### Vortrag

*American Thoracic Society, Philadelphia, 22. Mai 2013*; Structural and functional changes of the lung following low dose single and multiple carbon black nanoparticle applications. N. Schreiber<sup>1</sup>, M. Stroebele<sup>2</sup>, J. Kopf<sup>3</sup>, R. Hochscheid<sup>1</sup>, E. Kotte<sup>1</sup>, P. Weber<sup>1</sup>, B. Mueller<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Philipps University - Marburg/DE, <sup>2</sup>University of Karlsruhe - Karlsruhe/DE, <sup>3</sup>Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM – Hannover/DE

*Symposium, Good Particles – Bad Particles, Interaction of (Carbon) Nano Particles with Lung Cells, Borstel, 24./25. Oktober 2013*; Toxicological effects of functionalized Carbon Black Nanoparticles on Type II pneumocytes. N. Schreiber, R. Hochscheid, E. Kotte, P. Weber, B. Mueller, Philipps University - Marburg/DE



**Poster**

*American Thoracic Society, San Francisco, 18. - 22. Mai 2012;* Low Dose Carbon Nanoparticle Application Induces Lung Inflammation. N. Schreiber<sup>1</sup>, M. Stroebele<sup>2</sup>, R. Hochscheid<sup>1</sup>, E. Kotte<sup>1</sup>, P. Weber<sup>1</sup>, H. Bockhorn<sup>2</sup>, B. Mueller<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Philipps University - Marburg/DE, <sup>2</sup>University of Karlsruhe - Karlsruhe/DE

*BMBF – NanoCare and NanoNature Clustermeeting, Frankfurt, 15. Januar 2013;* Toxicological effects of Carbon Black Nanoparticles on Type II pneumocytes and Clara cells. N. Schreiber, R. Hochscheid, E. Kotte, P. Weber, B. Mueller, Philipps University - Marburg/DE

*American Thoracic Society, San Diego, Mai 2014;* Suspension media modulate carbon black nanoparticle interactions with lung tissue. N. Schreiber, R. Hochscheid, E. Kotte, P. Weber, B. Mueller, Philipps University - Marburg/DE (Poster)

**III Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privatdozenten der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald:

Alberti, Bode, Ehlers, Endlich, Fischer, Giebel, Gliesche, Grisk, Gürtler, Hecker, Herrmann, Hildebrandt, Jabs, Kahlert, Kaiser, Klöting, König, Langer, Melzer, Müller-Motzfeld, Schauer, Schlosser, Schnittler, Scholz, Schüller, Schweikhard, Stöhr, Succow, Walther, Wulff

## IV Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. B. Müller, Leiter des Zellbiologischen Labors der Lunge der Abteilung für Pneumologie der Philipps-Universität Marburg für die Bereitstellung und Betreuung der Doktorarbeit. Insbesondere möchte ich mich für die vielen Ratschläge und kreativen Diskussionen bedanken, welche wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. S. Bauer danke ich für die Annahme meines Themas als naturwissenschaftliche Promotion.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. R. Hochscheid für die vielen fachlichen Ratschläge und Anregungen bei der täglichen Laborarbeit und für das Lektorat des Manuskriptes.

Mein Dank gilt weiterhin Frau E. Kotte und Frau P. Weber für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und den zahlreichen Tipps, insbesondere im Umgang mit den Versuchstieren und während der Tier-OPs. Außerdem danke ich Frau E. Kotte für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. A. Ramaswamy und Dr. A. Schmidt aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Marburg für die Unterstützung bei der histologischen Begutachtung der Lungenschnitte.

Herrn Dipl. Psych. W. Cassel aus dem Schlafmedizinischen Zentrum des Universitätsklinikums Marburg danke ich für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Für die Unterstützung bei der Lungenfunktionsprüfung und den LDH-Messungen bedanke ich mich bei Herrn T. Ruppertsberg und Dr. T. Stief vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg.

Mein Dank gilt außerdem allen am BMBF geförderten „Carbon Black“ Verbundprojekt beteiligten Wissenschaftlern. Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ing. H. Bockhorn und Herrn Dipl. Chem. M. Ströbele für die Synthese und Charakterisierung der Carbon Black Nanopartikel am Karlsruher Institut für Technologie, sowie Frau Dr. T. Hansen und Herrn Dr. J. Kopf vom Fraunhofer Institut Hannover für die Bereitstellung und Prüfung der zu testenden Partikelsuspensionen.